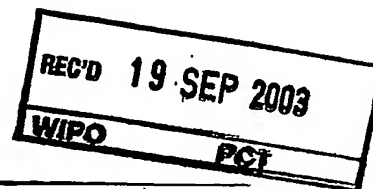


BEST AVAILABLE COPY



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 19 SEP 2003

WIPO

PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

16 JUIN 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 300301

Réservé à l'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
REMISE DES PIÈCES DATE 11 JUIN 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0207175 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 11 JUIN 2002 PAR L'INPI		Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 239896 D20396 NR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
NANOCAPSULES LIPIDIQUES FURTIVES, PROCEDE DE PREPARATION ET UTILISATION COMME VECTEUR DE PRINCIPE(S) ACTIF(S).			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Sulte»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Sulte»	
Nom ou dénomination sociale		ETHYPHARM	
Prénoms			
Forme juridique		SOCIETE ANONYME	
N° SIREN		311599833	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	21 rue Saint Mathieu 78550 HOUDAN	
	Code postal et ville		
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 11 JUIN 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0207175 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 300301
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		239896 D20396 NR	
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles	
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 44 29 35 00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 44 29 35 99	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		info@regimbeau.fr	
7 INVENTEUR(S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE			
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. MARTIN	

5 L'objet de la présente invention concerne des nanocapsules qui, à titre de vecteur de principe(s) actif(s), peuvent être utilisées pour le traitement des tumeurs cancéreuses solides ou circulantes, qui présentent une certaine furtivité vis à vis du système immunitaire de l'hôte auquel elles sont administrées et qui sont capables, non seulement d'être extravasées au
10 niveau tumoral, mais également d'y libérer leur contenu. Ce nouveau vecteur conforme à l'invention se présente avantageusement sous la forme d'une suspension colloïdale injectable de nanocapsules lipidiques portant à leur surface des molécules de phospholipides associées à des molécules de poly(éthylène glycol).

15 La présente invention concerne en outre le procédé de synthèse de ces nanocapsules lipidiques furtives, et en particulier le procédé d'insertion desdites molécules portant des groupements poly(éthylène glycol) dans l'enveloppe lipidique des nanocapsules préalablement formées.

Enfin, cette invention concerne à la fois les utilisations qui peuvent
20 être faites d'un tel vecteur, pour la délivrance par voie sanguine de principes actifs, en particulier pour le traitement des tumeurs solides ou circulantes chez l'Homme, mais également pour le traitement des inflammations ou de toute autre pathologie pour laquelle on observe une augmentation de la perméabilité vasculaire (zones inflammatoires, foyers infectieux).

25 La présente invention concerne en outre les différentes compositions pharmaceutiques comprenant les nanocapsules selon la présente invention.

Tout d'abord, on entend par vecteur toute entité chimique permettant le transport et la délivrance dans l'organisme auquel il est administré de molécules et en particulier de principes actifs, telles que des médicaments
30 par exemple.

Par ailleurs, on entend par colloïdale toute dispersion stable d'éléments solides ayant une taille inférieure à 1 micromètre dans une phase liquide.

5 Le terme furtif employé pour qualifier le vecteur conforme à la présente invention désigne la capacité des nanocapsules à n'être pas ou peu et/ou tardivement détectées puis séquestrées et/ou dégradées par le système immunitaire de l'hôte auquel elles sont administrées.

10 On emploie le terme extravasation pour désigner la sortie d'un corps du compartiment sanguin. Cette sortie s'effectue au travers de pores ou "fenestrations", de manière tangentielle à l'axe du capillaire sanguin. Ce phénomène s'observe seulement au niveau de certains organes dont les capillaires sont fenestrés, comme le rein ou le foie par exemple et en particulier les tumeurs solides extracérébrales.

15 On entend par nanocapsules, des sphères de diamètre inférieur à 300 nm comportant une paroi circulaire plus ou moins rigide à température ambiante et une partie centrale ou cœur qui, dans le cas de la présente invention contient des corps gras.

20 On emploie le terme amphiphile pour qualifier une molécule porteuse de groupements présentant une affinité pour les substances de nature hydrophobe et de groupements présentant une affinité pour les substances de nature hydrophile.

Enfin, mol % exprime un pourcentage molaire et le terme principe actif désigne un principe pharmaceutiquement actif.

25 Les nanocapsules lipidiques furtives objets de la présente invention sont constituées d'un cœur essentiellement lipidique liquide ou semi-liquide à température ambiante et d'une enveloppe lipidique externe comprenant au moins un tensioactif hydrophile de nature lipidique, au moins un tensioactif lipophile de nature lipidique et au moins un dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) (PEG) dont la masse molaire de la partie poly(éthylène glycol) est supérieure ou égale à 1000 g/mol, de préférence supérieure ou
30 égale à 2000 g/mol.

Le dérivé amphiphile "pegylé" contribue à conférer l'aspect furtif aux nanocapsules. Le cœur des nanocapsules permet avantageusement l'incorporation et le transport de nombreuses molécules et plus particulièrement de principes actifs de nature lipophile, tels que les anticancéreux, transportés sous forme dissoute. Les nanocapsules conformes à l'invention sont ainsi capables de véhiculer dans le système sanguin et plus particulièrement dans le milieu interstitiel bordant les tumeurs, des médicaments anticancéreux pendant des périodes de temps prolongées. Par ailleurs, les nanocapsules conformes à l'invention présentent un temps de circulation sanguin suffisamment long leur permettant des interactions avec des cellules tumorales circulantes.

Les tumeurs dites solides sont constituées de cellules tumorales organisées en amas solides ou en tissus irrigués par la circulation sanguine. La plupart des tumeurs sont irriguées par un réseau de capillaires fenestrés. Ces capillaires présentent ainsi des sortes de pores qui autorisent, suivant leur taille, le passage d'éléments solides hors du compartiment sanguin. La taille des fenestrations entre les cellules endothéliales de la membrane basale des vaisseaux tumoraux varie d'une tumeur à l'autre. Cependant, des particules colloïdales de taille inférieure à 300nm peuvent être extravasées au niveau de certaines tumeurs. Cette perméation de particules colloïdales vers le milieu interstitiel tumoral est par ailleurs combinée à un effet de rétention accru dû à un faible drainage lymphatique tumoral. Ce double phénomène, dénommé EPR pour *Enhanced Permeability and Retention* a permis d'envisager le développement d'une thérapie antitumorale basée sur des systèmes vecteurs colloïdaux. En effet, l'EPR permet une accumulation significativement prolongée comparativement à ce qu'on observe sur des tissus sains, de particules colloïdales et de macromolécules aux abords de la tumeur.

Ce phénomène EPR a ainsi été exploité pour la constitution de vecteurs colloïdaux destinés au transport de principes actifs anticancéreux. Cependant, pour être véritablement efficaces, de tels vecteurs doivent pouvoir agir dans le compartiment sanguin, et en particulier, aux abords des

tumeurs pendant des périodes de temps les plus longues possibles, avant d'être détectés puis détruits par le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, les objets colloïdaux non furtifs sont rapidement détectés par certains acteurs du système immunitaire, tels que les macrophages notamment et ne peuvent
 5 atteindre les tumeurs en quantité suffisante pour être efficaces.

En effet, les macrophages constituent l'une des plus importantes composantes du système immunitaire et jouent un rôle prépondérant dans l'élimination de la circulation sanguine des particules étrangères, incluant les liposomes et d'autres particules des systèmes colloïdaux.

10 L'expression reconnue pour désigner cet ensemble de monocytes circulants et sédentaires qui constituent le système de défense non-spécifique impliqué dans la capture de nanoparticules est « le Système des Phagocytes Mononucléés » (SPM).

Au niveau moléculaire la clairance des particules injectées s'effectue
 15 en deux étapes : l'opsonisation par le dépôt de protéines sériques (ou "opsonines") à la surface des particules suivie de la reconnaissance et de la capture des particules opsonisées par les macrophages.

La modification de la surface des nanoparticules par des chaînes de polymères hydrophiles et flexibles, généralement de type poly(éthylène glycol), leur confère une protection de type stérique en empêchant les
 20 opsonines d'atteindre la surface des particules et de précipiter leur élimination par les cellules du SPM. L'efficacité de ces chaînes polymères à conférer un caractère furtif dépend à la fois de leur longueur et de leur densité. Ainsi, Mori *et al.* (FEBS Lett., **284**: 263, 1991) ont effectué des
 25 études comparatives avec des phospholipides comprenant des chaînes de PEG 750, 2000 et 5000 g/mol présents à la surface de liposomes de 200 nm. A pourcentage molaire égal, le PEG 750 s'est avéré complètement inefficace *in vitro* pour conférer une protection stérique contre l'opsonisation. Les chaînes de PEG plus longues présentent en revanche une efficacité contre
 30 l'opsonisation qui est proportionnelle à leur longueur. Ce comportement *in vitro* se trouve corrélé avec les demi-vies des liposomes après injection intraveineuse chez la souris, qui sont : inférieure à 30 minutes, d'environ 2

heures et de plus de 3 heures pour le PEG 750, le PEG 2000 et le PEG 5000 respectivement.

5 D'autres études (Allen *et al.*, BBA, 1066: 29, 1991) ont également permis de montrer qu'en dessous de 1000 g/mol les chaînes de poly(éthylène glycol), même lorsqu'elles sont à concentration saturante à la surface des nanoparticules, ne leur permettent pas de conférer une protection stérique suffisante et donc un caractère furtif.

10 La construction de vecteurs furtifs destinés au transport de principes actifs anticancéreux permet non seulement d'augmenter leur effet thérapeutique mais également d'assurer ainsi une certaine invisibilité vis à vis du phénomène d'opsonisation et du système immunitaire. Par ailleurs, cette augmentation de leur temps de demi-vie sanguine (conséquence de l'effet furtif) sert également à diminuer la toxicité des principes actifs transportés qui seront majoritairement libérés au niveau du tissu interstitiel
15 tumoral avec une diffusion très limitée au niveau des tissus sains et du foie en particulier.

En effet, les principes actifs anticancéreux sont généralement des molécules de petite taille présentant une forte cytotoxicité, particulièrement prononcée sur les cellules en division. Par ailleurs, leur concentration
20 thérapeutique efficace est parfois très peu éloignée de la concentration plasmatique à laquelle ils deviennent toxiques pour l'organisme auquel ils sont administrés. Cette étroite fenêtre de concentration nécessite l'emploi de vecteurs pour l'administration de tels composés. Le recours à des vecteurs furtifs leur permet de s'accumuler au niveau du tissu interstitiel des tumeurs
25 et d'y libérer leur actif. En raison de cette accumulation, la concentration intratumorale en principe actif est très élevée, bien supérieure à la concentration qui peut être atteinte à l'aide de vecteurs conventionnels ou encore avec le principe actif seul (Allen, Trends. Pharm. Sci., 15: 215, 1994). Les systèmes colloïdaux furtifs permettent donc d'utiliser des doses plus
30 élevées en anticancéreux, supérieures à celles qu'il est possible d'administrer avec le principe actif seul en raison de leur forte toxicité.

L'accumulation de nanoparticules au niveau des tumeurs et l'effet thérapeutique résultant dépend des demi-vies d'élimination de la circulation sanguine. Ainsi diverses formulations de liposomes de type conventionnels ou présentant une circulation prolongée ont été comparées sur la base de leur profil d'élimination sanguin et de leur accumulation au niveau des tumeurs chez la souris (Gabizon A. et Papahadjopoulos D., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 85:6949, 1988). Ainsi, une formulation furtive présentant une demi-vie d'environ 8 heures montre une accumulation de plus de 10% de la dose injectée au niveau des tumeurs au bout de 24 heures. Des formulations témoins ayant des demi-vies légèrement inférieures à une heure présentent des accumulations au niveau des tumeurs beaucoup plus faibles que celle observée pour la formulation furtive. En effet, les concentrations intratumorales à 24h des formulations témoins représentent 4 à 16% seulement de la quantité dosée au niveau des tumeurs dans le cas de la formulation furtive. Ces résultats montrent que des formulations présentant des demi-vies de l'ordre d'une heure ou inférieures à l'heure présentent peu d'efficacité pour conduire à des phénomènes d'accumulation conséquents au niveau des tumeurs.

Les systèmes colloïdaux tels que les liposomes ou les nanoparticules, c'est à dire constitués par des particules en suspension de 25nm à 1µm de diamètre, ont permis le développement et la mise sur le marché de différentes formes pharmaceutiques colloïdales.

Ainsi, le brevet N° US 5,811,119 décrit l'utilisation de liposomes pour l'administration de médicaments anticancéreux dérivés des caroténoïdes. Cette formulation liposomale permet notamment de réduire la toxicité de ces principes actifs dans l'organisme. Les caroténoïdes destinés au traitement des tumeurs sont ici associés à un agent promoteur d'intercalation qui permet leur transport au sein du liposome. Le transport de ces principes actifs lipophiles au sein d'un liposome dont le cœur est de nature hydrophile est permis grâce à la présence de composés amphiphiles tels que des triglycérides. Ces "agents promoteurs d'intercalation" permettent de réaliser

le transport de caroténoïdes dans un rapport de 10 moles de triglycérides pour une mole de caroténoïde.

Un tel vecteur permet d'envisager le transport d'agents anticancéreux en diminuant leur cytotoxicité, mais présente un faible taux d'encapsulation et par ailleurs ne permet ni un ciblage précis des tumeurs, ni une
5 augmentation de la durée de vie de ces vecteurs dans le compartiment sanguin. En effet, l'inconvénient majeur du vecteur de type liposome est sa faible stabilité dans la circulation, du fait notamment de sa biodégradation rapide par les enzymes circulantes.

10 Le document N° US 5,527,528 décrit l'utilisation de liposomes modifiés pour le transport et l'administration de médicaments anticancéreux. Les liposomes décrits ont une taille comprise entre 50 et 120 nm, contiennent un composé antitumoral tel que la cytarabine et présentent à leur surface des chaînes moléculaires de poly(éthylène glycol) en concentration
15 suffisante pour augmenter de façon significative le temps de circulation desdits liposomes dans le compartiment sanguin de l'hôte auquel ils sont administrés. Par ailleurs, ces liposomes portent également à leur surface des anticorps spécifiques de certains antigènes tumoraux, permettant un ciblage actif des liposomes contre les tumeurs.

20 Ce document divulgue un vecteur assurant à la fois un transport prolongé de principes actifs dans la circulation et un certain ciblage à l'encontre du type de tumeur visée.

Cependant, ce type de vecteur présente un inconvénient majeur. En effet, celui-ci est surtout intéressant pour les anticancéreux de nature
25 hydrophile tels que la cytarabine ou la gentamycine par exemple. Là encore, le transport de principes actifs lipophiles et notamment d'anticancéreux tels que la daunomycine par exemple est limité. Ces composés sont transportés par incorporation dans la double couche phospholipidique des liposomes. De ce fait, le rendement d'incorporation, demeure faible puisque le volume du
30 cœur du liposome n'est pas exploité pour le transport. Le principal inconvénient de ces systèmes est représenté par une capacité limitée

d'incorporation pour les médicaments lipophiles en raison du rapport défavorable entre les volumes des compartiments aqueux et lipophile.

De plus, l'incorporation membranaire de principes actifs va dépendre de leur degré de solubilisation dans l'environnement lipidique de cette double
5 couche phospholipidique. Il est difficile de moduler le caractère lipophile au sein de cette bicouche étant donné que le choix de ses composants, en l'occurrence les phospholipides, est limité. Ce type de vecteur ne permet donc pas d'ajuster la HLB* (Balance Hydrophile Lipophile) du milieu de transport sur la liposolubilité du principe actif transporté avec autant de
10 facilité que le cœur des nanocapsules conformes à l'invention pour lesquelles le choix des constituants du cœur offre une plus grande versatilité. Les rendements d'incorporation sont donc dépendants du taux de solubilité du principe actif dans la membrane liposomale. Ainsi, les liposomes ne sont pas susceptibles d'incorporer plus de 5 mol% (le plus souvent 1 à 2%) de
15 principes actifs hydrophobes dans leur membrane par rapport à la totalité des lipides entrant dans la composition de la bicouche lipidique (Lasic, Trends Biotechnol. 16:307, 1998).

*L'indice HLB ou balance hydrophile/lipophile est tel que défini par C. Larpent dans le Traité K.342 des Editions "*Techniques de l'ingénieur*".

20 Les liposomes commercialisés sous la marque Doxil® et destinés au transport de principes actifs anticancéreux sont également des objets présentant une certaine furtivité dans le compartiment sanguin. Ces liposomes présentent à leur surface des molécules de PEG insérées dans la double couche phospholipidique et assurent ainsi un ciblage passif à
25 l'encontre des tumeurs. Ces vecteurs contiennent un principe actif destiné au traitement des tumeurs cancéreuses : la doxorubicine.

Ce principe actif est "chargé" à l'intérieur des liposomes par un mécanisme de "*loading actif*" qui résulte de la différence de pH entre le milieu extérieur où se trouve la doxorubicine et le milieu intraliposomal. Ce
30 gradient de pH permet l'entrée de la doxorubicine dans les liposomes où ce

principe actif va alors passer sous forme de gel. Ce mécanisme de remplissage permet un rendement de chargement en principe actif élevé.

Cependant, ce mécanisme n'est exploitable que pour certains principes actifs ayant un caractère amphiphile, de la facilité à diffuser
5 facilement à travers la bicouche lipidique (donc des petites molécules), ainsi que des propriétés de précipitation ou complexation en fonction d'un gradient de pH comme la doxorubicine ou la mitoxantrone et n'est pas applicable à la majorité des anticancéreux. Les principes actifs qui ne peuvent bénéficier de ce mécanisme présentent de faibles rendements de charge et nécessitent
10 des étapes ultérieures de séparation sur colonne et de recyclage du principe actif.

En outre, l'utilisation de liposomes comme vecteurs de principes actifs présente d'autres inconvénients. En particulier, la présence de la double
couche phospholipidique limite physiquement la taille des liposomes obtenus
15 qui peuvent difficilement atteindre des tailles inférieures à 50 nm environ du fait de la valeur limite du rayon de courbure pouvant être atteint par cette membrane.

L'utilisation de vecteurs liposomaux implique donc certains inconvénients majeurs, notamment dans leur capacité à transporter la plupart
20 des substances anticancéreuses, mais également quant à leur facilité d'emploi et de stockage.

En effet, de tels vecteurs liposomaux ne peuvent être aisément lyophilisés sans perdre leurs propriétés structurales et leur capacité de
transport lors de la reconstitution de la solution colloïdale. De ce fait les
25 suspensions liposomales présentent une stabilité assez faible et des temps de conservation relativement peu élevés.

Pour tenter de pallier ces inconvénients qui limitent l'efficacité de ce type de vecteurs utilisés en thérapie anticancéreuse, des vecteurs colloïdaux non liposomaux ont été développés. Les micelles à base de polymères
30 offrent en effet une bonne alternative aux liposomes en terme de transport de principes actifs lipophiles et en particuliers d'agents anticancéreux.

Ainsi, le document N° WO 02/00194 décrit un vecteur colloïdal sous la forme de micelles à base de polymères. Ce vecteur permet entre autre le transport et la délivrance de principes actifs anticancéreux tels que la doxorubicine ou le méthotrexate par exemple. Les micelles revendiquées comportent une partie centrale hydrophobe au sein de laquelle un agent anticancéreux lipophile peut être inséré et une "coquille" externe de nature hydrophile. Ces micelles correspondent en effet à un assemblage de polymères di-bloc comportant une moitié hydrophile à base de poly(vinylpyrrolidone) et une moitié hydrophobe constituée de poly(acide lactique). La partie centrale hydrophobe correspond au rassemblement des parties centrales hydrophobes des molécules de polymères composant ces micelles. Ce vecteur permet, outre sa capacité au transport de molécules hydrophobes, de présenter des particules de très petite taille, et notamment inférieures à 100 nm, ce qui est difficilement réalisable dans le cas des liposomes.

D'autres types de micelles polymères ont également été développées dans le but de véhiculer des principes actifs dans le sang pendant des temps prolongés (Stolnik *et al.*, J. Drug Target., 9: 361, 2001). Ce type de vecteur présente également une structure de type polymère bi-bloc, la partie hydrophobe étant constituée de poly(acide lactique) et la partie hydrophile étant représentée par du poly(éthylène glycol). En fonction de la longueur de chacun des blocs, les micelles PLA-PEG obtenues ont différentes tailles, plus généralement autour de 75 nm. L'injection intraveineuse de ces micelles à des rats fait preuve d'un certain caractère furtif avec une demi-vie d'élimination comprise entre 1 et 2 heures ; 25% de la dose injectée est encore présente dans le sang au bout de 3 heures.

En revanche, les vecteurs à base de micelles présentent l'inconvénient d'être relativement peu stables dans l'organisme et rapidement désorganisables. En effet, la stabilité des micelles dépend de la concentration micellaire critique (CMC) en deçà de laquelle, les molécules polymériques qui les constituent se désassemblent. Cette stabilité relative

rend délicate l'utilisation industrielle de micelles pour la délivrance thérapeutique de substances anticancéreuses.

Ainsi, des vecteurs à base de nanoparticules, autres que des liposomes, ont été développés pour pallier le manque de stabilité des vecteurs colloïdaux existants et/ou leur faible efficacité dans le transport de molécules de nature lipophile.

Ainsi, le brevet WO 01/64328 décrit de telles nanocapsules lipidiques comportant une surface lipidique rigide et un cœur liquide ou semi-liquide composé d'esters d'acides gras et de triglycérides. La surface rigide de ces nanocapsules est composée en partie de Lipoïd® S 75-3, qui correspond à un mélange de plusieurs lécithines, et de Solutol® HS 15. Ce type de vecteur permet d'envisager le transport de principes actifs hydrophobes et notamment d'anticancéreux. Dans de telles nanoparticules, le principe actif lipophile est présent sous forme dissoute à l'intérieur du cœur dont la composition peut être modifiée de façon à ajuster la balance lipophile/hydrophile en fonction de la liposolubilité du principe actif choisi. Les nanocapsules lipidiques selon le brevet WO 01/64328 ont fait l'objet d'une évaluation de leur comportement sanguin *in vivo* suite à leur injection intraveineuse chez des rats (Cahouet *et al.*, « 13^{èmes} Symposium International sur la Microencapsulation », Angers (France), Sept. 2001). Le Solutol® HS 15 qui compose la surface de ces nanoparticules est une molécule composée par une partie hydrophobe et une courte chaîne de poly(éthylène glycol) de 660 g/mol orientée vers l'extérieur. Comme mentionné précédemment, des chaînes de PEG si courtes, même en forte densité, ne sont pas suffisamment efficaces pour conférer aux nanoparticules une protection stérique envers l'opsonisation et donc un certain caractère furtif. Ainsi, le temps de demi-vie de ces nanocapsules lipidiques est faible puisqu'il est de 45 minutes environ. Ces nanocapsules lipidiques circulent toutefois plus longtemps que des petites molécules telles que les marqueurs radioactifs seuls. Le temps de demi-vie des nanocapsules lipidiques conformes au brevet WO 01/64328 ne serait donc pas suffisant pour leur permettre de circuler pendant des temps prolongés afin de pouvoir s'accumuler au niveau

des tumeurs (dans des organes autres que le foie et la rate), comme évoqué précédemment.

D'autres types de nanocapsules lipidiques présentant cette fois-ci une certaine furtivité chez la souris, et destinées au transport de principes actifs anticancéreux ont été réalisées et décrites par Mosqueira *et al.* (Pharm Res, 18: 1411, 2001). De telles nanocapsules lipidiques présentent à la fois un cœur composé de corps gras qui autorise la dissolution et donc le transport de principes actifs lipophiles, en particulier d'agents anticancéreux et une croûte rigide externe de polymères sur laquelle sont greffées des chaînes de PEG leur assurant une certaine furtivité vis à vis du système immunitaire.

Ces nanocapsules, d'environ 200 nm de diamètre, présentent un temps de résidence dans la circulation sanguine significativement supérieur à celui des mêmes nanoparticules dépourvues desdites molécules de surface. Cependant, ces résultats de furtivité ont été obtenus sur la souris, dont le système immunitaire présente une capacité d'opsonisation plus faible que celle qui est observée chez le rat ou chez l'Homme par exemple. Leur relative efficacité d'échappement face au système immunitaire de la souris ne permet donc pas d'extrapoler ces résultats aux systèmes immunitaires du rat ou de l'Homme qui sont plus puissants en terme de capacité d'opsonisation (Liu D. *et al.*, BBA, **1240**: 277, 1995).

Par ailleurs, leur relativement grand diamètre ne leur permettrait pas d'être facilement extravasées au niveau de la plupart des tumeurs solides. Ainsi, même si le temps de résidence dans le compartiment sanguin est augmenté, le ciblage tumoral reste réduit ce qui limite d'autant leur efficacité thérapeutique.

Des nanosphères composées de polymères en structure bi-bloc de PLA-PEG, présentant un caractère furtif chez le rat, avec une demi-vie d'élimination de 6 heures ont été également élaborées (Verrecchia *et al.*, J. Control. Rel. **36**:49, 1995). La partie hydrophobe du polymère est constituée de poly(acide lactique) de 30 000 g/mol, la chaîne hydrophile est composée de poly(éthylène glycol) de 2 000 g/mol. Ces nanoparticules présentent une

surface peu favorable à l'activation du complément ce qui a pour conséquence de diminuer les phénomènes d'opsonisation et la phagocytose par les cellules du SPM.

5 Toutefois l'inconvénient majeur de ce type de nanoparticules à base de polymères solides de type PLA réside dans leur faible capacité à libérer le principe actif rapidement, une fois aux abords de l'amas de cellules tumorales. En effet, la croûte rigide externe de ces nanocapsules est composée de polymères de l'acide lactique (PLA), et est dégradée de façon relativement lente par les mécanismes de biodégradation de l'organisme.

10 Cette bio-érosion faible implique une libération lente des principes actifs contenus dans ces nanocapsules. Or l'efficacité thérapeutique de tels vecteurs anticancéreux, vient d'une part de leur capacité à échapper au système immunitaire, et d'autre part de leur capacité à libérer de façon rapide, c'est-à-dire en moins de 24 heures leur contenu aux abords de la

15 tumeur. Or, les nanoparticules décrites par Mosqueira ou Verrecchia ne sont pratiquement pas dégradées au bout d'un séjour de 24 heures dans l'organisme, ce qui ne permet pas d'envisager un traitement véritablement efficace des tumeurs solides.

La présente invention propose ainsi un nouveau vecteur de principe(s)

20 actif(s) permettant à la fois d'éviter la plupart des inconvénients observés sur les vecteurs liposomaux et d'améliorer l'efficacité de ciblage et de libération de principe(s) actif(s) au niveau de la tumeur par rapport aux vecteurs colloïdaux non liposomaux existant.

Le but de la présente invention est aussi de fournir un nouveau type

25 de vecteur furtif de principe(s) actif(s) qui permet un traitement plus efficace des cancers, en particulier des tumeurs solides ou circulantes.

En effet, les nanocapsules selon la présente invention en tant que vecteur de principe(s) actif(s) peuvent être utilisées pour le traitement des tumeurs solides puisque les caractéristiques de taille et de furtivité des

30 nanocapsules conformes à l'invention permettent à ces nanocapsules d'approcher et de pénétrer ces tumeurs par un phénomène d'extravasation. On parle dans ce cas de ciblage passif des tumeurs. Ainsi, la demanderesse

a le mérite d'avoir su concevoir un vecteur composé de nanoparticules lipidiques furtives permettant un ciblage passif des tumeurs visées.

En outre, les nanocapsules selon la présente invention en tant que vecteur de principe(s) actif(s) peuvent être utilisées pour le traitement de tumeurs circulantes par un phénomène de ciblage actif. Ce ciblage actif est réalisé par la fixation à la surface desdites nanocapsules de molécules ou "ligands" spécifiques de certaines molécules de surface des tumeurs circulantes. La fixation de telles molécules de surface est avantageusement réalisée au cours du procédé de synthèse des nanocapsules par post-insertion tel que décrit plus loin. D'une manière générale, les nanocapsules conformes à l'invention en tant que vecteur de principe(s) actif(s) peuvent être utilisées pour le traitement des tumeurs de nature solide ou circulantes par ciblage actif, lorsqu'elles présentent des récepteurs susceptibles d'être reconnus par un ligand ou par ciblage passif (sans intervention d'un récepteur).

Les nanocapsules selon la présente invention en tant que vecteur de principe(s) actif(s) présentent de surcroît une libération rapide, donc plus efficace, de ce(s) principe(s) actif(s) dans l'environnement immédiat de la tumeur. Une telle libération rapide est permise par la biorésorption rapide des constituants desdites nanocapsules, notamment grâce à l'action des enzymes circulant dans l'organisme.

Cette caractéristique de biodégradation notamment par digestion enzymatique, est un avantage supplémentaire de la présente invention qui permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique des principes actifs administrés par ce biais.

Le vecteur conforme à l'invention présente en outre des qualités de furtivité intéressantes vis à vis du système immunitaire et une parfaite biodégradabilité assortie d'une absence totale de toxicité. En effet, la totalité des constituants du vecteur conforme à l'invention sont biodégradables et assimilables rapidement dans l'organisme, font tous l'objet d'une approbation pour usage parentéral et sont de surcroît formulés sans solvant organique.

Le nouveau vecteur colloïdal furtif conforme à l'invention présente aussi l'avantage d'être lyophilisable et stérilisable facilement, sans perdre ses qualités de furtivité ou de transport lors de sa reconstitution sous forme de suspension.

5 Ce vecteur permet en outre d'administrer par voie vasculaire des médicaments destinés au traitement des inflammations tissulaires.

Les nanocapsules lipidiques selon la présente invention ont un diamètre avantageusement compris entre 50 et 150 nm, préférentiellement compris entre 80 et 120 nm.

10 La taille desdites nanocapsules joue un rôle au niveau du ciblage passif des anticancéreux tumoraux. En effet, l'effet EPR observé au niveau tumoral permet le passage et la rétention dans le milieu interstitiel qui borde la tumeur solide, d'éléments présents dans le sang dont le diamètre est suffisamment faible pour autoriser cette extravasation. Les nanocapsules
15 conformes à l'invention sont réalisées par un procédé permettant avantageusement de moduler leur taille. Par ailleurs, elles possèdent des capacités de furtivité qui leur assurent un temps de demi-vie dans le compartiment sanguin supérieur à deux heures. Ces deux caractéristiques permettent avantageusement de favoriser le phénomène d'extravasation en
20 augmentant le nombre de passages des nanocapsules au voisinage des fenestrations des capillaires tumoraux. Le caractère furtif des nanocapsules conformes à l'invention est également susceptible de favoriser les contacts avec des cellules malignes présentes dans la circulation sanguine, dans le cas de tumeurs circulantes.

25 L'extravasation correspond à un phénomène de filtration tangentielle, ce qui signifie qu'une tumeur présentant des pores d'un diamètre de 200 nm ne laissera que difficilement passer des objets circulant d'un même diamètre. Par ailleurs, la taille des nanocapsules conformes à l'invention leur permet d'éviter une capture par extravasation au niveau des cellules du foie. En
30 effet, les fenestrations des capillaires sinusoïdes du foie autorisent l'extravasation de particules de l'ordre de 50 nm. Enfin, lesdites nanocapsules doivent avoir une taille inférieure à 200 nm afin d'éviter le

phénomène de filtration observé au niveau de la rate pour des particules de taille supérieure à celle-ci. Ainsi, la taille définie des nanocapsules est responsable à la fois du phénomène de ciblage passif favorisé par l'EPR, et à la fois de l'augmentation du temps de rémanence desdites nanocapsules dans la circulation sanguine en leur évitant les phénomènes de filtrage et d'extravasation hépatique.

Le diamètre des nanocapsules est ajustable en fonction du type de tumeurs à traiter et pourra, le cas échéant, être légèrement inférieur ou supérieur à l'intervalle précité.

La taille des nanocapsules doit en effet être adaptée à la taille des fenestrations des tumeurs à détruire, taille qui peut varier dans le temps, en fonction de la maturité de la tumeur, et dans l'espace, au sein d'une même tumeur. De ce fait, le ciblage passif du vecteur conforme à l'invention n'est envisageable au niveau thérapeutique que si la taille des nanocapsules conformes à l'invention peut être ajustée de façon précise. Or la demanderesse a avantageusement mis au point un procédé permettant de synthétiser de façon précise des nanocapsules furtives de taille variable et contrôlable. Le présent vecteur comporte ainsi des capacités d'adaptation à l'environnement tumoral qui le rendent d'autant plus efficace.

L'enveloppe lipidique externe des nanocapsules selon la présente invention comprend un tensioactif lipophile de nature lipidique. Ce tensioactif se présente avantageusement sous la forme d'une lécithine dont la proportion en phosphatidylcholine est au moins égale à 95 %, préférentiellement supérieure à 99 %.

La demanderesse a constaté que la constitution de nanocapsules comportant un taux de phosphatidylcholine supérieur à 95 % permettait, chez le rat, d'augmenter significativement le temps de rétention et donc la furtivité de ces nanocapsules dans la circulation sanguine. Ainsi, des impuretés telles que d'autres phospholipides comme la phosphatidyl éthanolamine, les lysophospholipides ou des acides gras libres, pourraient contribuer à augmenter le phénomène d'opsonisation de ces nanoparticules. De plus, la demanderesse a également constaté que le rendement d'insertion des

molécules de lipide couplé aux molécules de PEG était meilleur lorsque le tensioactif lipophile présente une concentration initiale en phosphatidylcholine supérieure à 95 %.

Ainsi, la furtivité observée des nanocapsules conformes à l'invention pourrait tenir au fait que la surface externe de ces nanocapsules est constituée par un phospholipide pratiquement pur à base de phosphatidylcholine, qui ne déclenche quasiment pas les mécanismes d'opsonisation. Le taux de pureté en phosphatidylcholine joue un rôle dans les mécanismes d'échappement au système d'opsonisation.

Le tensioactif lipophile de nature lipidique représente avantageusement un pourcentage molaire compris entre 5 et 30 mol% des molécules lipidiques composant la dite enveloppe lipidique externe.

Ce tensioactif possède de préférence une température de transition de phase liquide à gel supérieure à 25°C, préférentiellement supérieure à 37°C, cela signifie qu'à température ambiante, ledit tensioactif est sous forme solide et ne passe sous forme liquide qu'à une température supérieure à 25°C, préférentiellement à 37°C. La température de transition liquide/gel joue un rôle dans la rigidité de l'enveloppe lipidique externe desdites nanocapsules. La rigidité de l'enveloppe externe offre aux nanocapsules selon l'invention une stabilité physico-chimique importante, à la fois en milieu aqueux lorsqu'elles sont en suspension, mais également lors de leur administration dans le compartiment sanguin. En effet, la rigidité de ladite enveloppe externe confère aux nanocapsules une cohésion leur permettant de résister aux modifications environnementales telles que les variations de pH ou de pression osmotique qui surviennent lors de l'injection.

Avantageusement, le tensioactif lipophile est un phospholipide portant des chaînes carbonées saturées, de préférence deux chaînes, chacune de ces chaînes comprenant au moins 16 atomes de carbones. De ce fait, on pourra choisir de préférence un phospholipide choisi parmi le DSPC (Distéaroyl Phosphatidylcholine) en C₁₈-C₁₈, le HSPC (Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine) en C₁₆-C₁₈ et le DPPC (Dipalmitoyl Phosphatidylcholine) en C₁₆-C₁₆. Préférentiellement, on pourra utiliser le

molécules de lipide couplé aux molécules de PEG était meilleur lorsque le tensioactif lipophile présente une concentration initiale en phosphatidylcholine supérieure à 95 %.

5 Ainsi, la furtivité observée des nanocapsules conformes à l'invention pourrait tenir au fait que la surface externe de ces nanocapsules est constituée par un phospholipide pratiquement pur à base de phosphatidylcholine, qui ne déclenche quasiment pas les mécanismes d'opsonisation. Le taux de pureté en phosphatidylcholine joue un rôle dans les mécanismes d'échappement au système d'opsonisation.

10 Le tensioactif lipophile de nature lipidique représente avantageusement un pourcentage molaire compris entre 5 et 30 mol% des molécules lipidiques composant la dite enveloppe lipidique externe.

15 Ce tensioactif possède de préférence une température de transition de phase gel à liquide supérieure à 25°C, préférentiellement supérieure à 37°C, cela signifie qu'à température ambiante, ledit tensioactif est sous forme solide et ne passe sous forme liquide qu'à une température supérieure à 25°C, préférentiellement à 37°C. La température de transition gel/liquide joue un rôle dans la rigidité de l'enveloppe lipidique externe desdites nanocapsules. La rigidité de l'enveloppe externe offre aux nanocapsules selon l'invention une stabilité physico-chimique importante, à la fois en milieu aqueux lorsqu'elles sont en suspension, mais également lors de leur administration dans le compartiment sanguin. En effet, la rigidité de ladite enveloppe externe confère aux nanocapsules une cohésion leur permettant de résister aux modifications environnementales telles que les variations de pH ou de pression osmotique qui surviennent lors de l'injection.

25 Avantageusement, le tensioactif lipophile est un phospholipide portant des chaînes carbonées saturées, de préférence deux chaînes, chacune de ces chaînes comprenant au moins 16 atomes de carbones. De ce fait, on pourra choisir de préférence un phospholipide choisi parmi le DSPC (Distéaroyl Phosphatidylcholine) en C₁₈-C₁₈, le HSPC (Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine) en C₁₆-C₁₈ et le DPPC (Dipalmitoyl Phosphatidylcholine) en C₁₆-C₁₆. Préférentiellement, on pourra utiliser le

30

HSPC à un taux de pureté supérieur à 99 % pour obtenir la meilleure rigidité et les meilleures qualités de furtivité des vecteurs objets de l'invention. Ce dernier composé entre dans la composition de formulations liposomales injectables commercialisées sous les noms Doxil[®] ou DaunoXome[®].

5 Par ailleurs, ladite enveloppe lipidique externe comprend un tensioactif hydrophile de nature lipidique, de préférence approuvé pour usage parentéral. Ce tensioactif hydrophile est avantageusement choisi parmi les poly(éthylène glycol) alkyl esters et les poly(éthylène glycol) alkyl éthers, ainsi que leurs mélanges.

10 Ce tensioactif hydrophile représente de préférence entre 60 et 90 mol% des molécules lipidiques composant ladite enveloppe lipidique externe. Ce tensioactif est de préférence employé dans une proportion molaire d'environ 80 mol% des molécules lipidiques composant l'enveloppe lipidique externe.

15 Ce tensioactif hydrophile sert, avec le tensioactif lipophile, à la formation de l'émulsion huile / eau nécessaire à la réalisation des nanocapsules selon l'invention. Il assure en effet la stabilisation des gouttelettes grasses formées à partir du mélange de triglycérides lors du procédé de synthèse desdites nanocapsules. Par ailleurs, ce tensioactif assure également la cohésion de ladite enveloppe lipidique externe. La proportion relativement forte de tensioactif hydrophile dans l'enveloppe desdites nanocapsules permet d'obtenir une tension interfaciale faible, permettant la réalisation de nanocapsules de diamètre d'autant plus faible que sa proportion est élevée.

25 On utilisera de préférence des tensioactifs non ioniques commercialisés sous les noms : Solutol[®] HS15 (BASF), Brij[®] (Uniquema) ou Mapeg[®] (BASF). On utilisera préférentiellement le Solutol[®] HS15, qui correspond au poly(éthylène glycol)-660 12-hydroxystéarate, comportant une courte chaîne de 15 unités d'éthylène glycol correspondant à un poids
30 moléculaire de 660 g/mol. Ce tensioactif est avantageusement approuvé

pour usage parentéral et plus particulièrement pour administration intraveineuse, de plus il donne de bons résultats en terme de cohésion.

Enfin, ladite enveloppe lipidique externe comprend un dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) ou PEG qui contribue efficacement à la furtivité desdites nanocapsules face aux acteurs du système immunitaire de l'hôte. En effet, le dérivé amphiphile du PEG permet à la fois de diminuer le phénomène d'opsonisation des nanocapsules, d'améliorer la stabilité de la solution colloïdale et de prolonger le temps de résidence de ces nanocapsules dans la circulation sanguine.

Le dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) comporte avantageusement une partie hydrophobe permettant son ancrage au niveau de ladite enveloppe lipidique externe et une partie hydrophile de type poly(éthylène glycol) tournée vers l'extérieur desdites nanocapsules lipidiques et qui confèrent à leur surface des propriétés hydrophiles.

Les dérivés amphiphiles du PEG sont insérés dans l'enveloppe externe desdites nanocapsules par leur extrémité hydrophobe. En conséquence, la partie PEG est tournée vers l'extérieur desdites nanocapsules et forme une sorte de couronne hydrophile protectrice entourant chacune des nanocapsules. L'extrémité hydrophobe permet l'ancrage à la surface de l'enveloppe externe. Cet ancrage est assuré par les forces de liaison de faible énergie qui lient entre elles les parties hydrophobes des lipides pégylés à celles des tensioactifs présents au niveau de la surface de ladite enveloppe lipidique. En effet, la cohésion de l'enveloppe lipidique externe des nanocapsules conformes à l'invention résulte des forces de Van der Waals qui s'exercent entre les groupements hydrophobes, et en particulier les chaînes alkyl des molécules composant cette enveloppe. Ces liaisons de faible énergie permettent à la fois de maintenir une cohésion suffisante entre les composants de l'enveloppe pour éviter une dégradation trop rapide des nanocapsules conformes à l'invention lors de leur introduction dans le compartiment sanguin mais leur confère cependant une fragilité suffisante pour assurer une biodégradabilité rapide et

donc une libération thérapeutiquement efficace des principes actifs transportés.

En effet, contrairement aux chaînes polymériques de type PLA (Poly Lactic Acid) ou PLAGA (Poly Lactic Acid and Glycolic Acid) qui constituent la surface des nanocapsules telles que décrites par Mosqueira et qui sont sous forme solide à toute température dans des conditions physiologiques, les chaînes grasses qui composent l'enveloppe des nanocapsules selon l'invention ne sont pas liées entre elles de façon covalente, et sont donc plus sujettes à se désassembler. En effet, la bioérosion est un phénomène de surface qui est la conséquence de l'attaque enzymatique ou de la biodégradation (ou biorésorption) naturelle liée aux conditions locales de pH et à la présence d'eau. Cette érosion est responsable de la perte de phospholipides à la surface des nanocapsules facilitant la sortie des principes actifs qui vont s'évacuer par diffusion à travers l'épaisseur de la couche de phospholipides.

Les chaînes polymères des nanocapsules à base de PLA ou de PLAGA sont longues (45000 g/mol pour les nanocapsules décrites par Mosqueira) et constituent une surface épaisse à la fois rigide et lisse. Leur biodégradation en est donc d'autant plus lente. Ainsi, il faut plus de 24 heures (voire plusieurs semaines) pour que la biodégradation des nanocapsules à base de PLA ou de PLAGA soit complète. Les phospholipides présents à la surface des nanocapsules selon l'invention sont des entités distinctes et permettent avantageusement une extraction de la surface et une biodégradation rapide, nécessaire à une libération thérapeutiquement efficace des principes actifs transportés.

Enfin, les constituants de l'enveloppe externe des nanocapsules sont tous non seulement biodégradables et approuvés pour usage parentéral et injection en intraveineuse, mais ils sont également assimilables par l'organisme. En effet des constituants tels que la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine sont présents de façon courante dans l'alimentation et sont assimilés par l'organisme de façon naturelle.

Ainsi, la taille des chaînes couvrant la surface des nanocapsules, ainsi que leur nature et la nature des liaisons chimiques qui les tiennent assemblées contribuent à rendre les nanocapsules selon l'invention à la fois stables dans le compartiment sanguin pendant plus d'une heure, et

5 rapidement biodégradables et assimilables par les enzymes circulantes ou présentes dans les fluides interstitiels en moins de 24 heures.

Avantageusement, la demi-vie des nanocapsules conformes à l'invention est supérieure à 2 heures. Idéalement on cherchera à atteindre pour les nanocapsules conformes à l'invention une demi-vie plasmatique

10 comprise entre 3 et 10 heures. Cette caractéristique permet avantageusement aux nanocapsules selon l'invention de s'accumuler au niveau des tumeurs et d'y libérer l'essentiel de leur contenu dans des délais raisonnables. L'efficacité de l'agent anticancéreux s'en trouve donc augmentée. Or, la rapidité de libération de l'agent antitumoral est un facteur

15 primordial à prendre en compte pour l'élimination des tumeurs solides compte-tenu de leur vitesse de croissance élevée.

Les dérivés amphiphiles du PEG utilisés dans la présente invention ont préférentiellement comme groupement hydrophobe une phosphatidyl éthanolamine. Il s'agit donc de phospholipides pégylés. Ainsi, on pourra

20 utiliser les phospholipides biodégradables, notamment choisis parmi le DPPE-PEG_x (Dipalmitoyl Phosphatidyl Ethanolamine), le DSPE-PEG_x (Distéaroyl Phosphatidyl Ethanolamine), le DOPE-PEG_x (Dioléoyl Phosphatidyl Ethanolamine) et le POPE-PEG (Palmitoyl Oléyl Phosphatidyl Ethanolamine) où x représente la taille de la molécule PEG en g/mol, ainsi

25 que leurs mélanges.

Préférentiellement, on utilisera comme phospholipide couplé à une molécule de poly(éthylène glycol) le DSPE-PEG_x pour ses qualités de stabilité dans l'enveloppe externe des nanocapsules conformes à l'invention.

De manière avantageuse, on utilisera le DSPE-PEG₂₀₀₀, le DSPE-PEG₃₀₀₀ et le DSPE-PEG₅₀₀₀.

30

Par ailleurs, l'effet furtif des nanocapsules selon la présente invention pourra également être obtenu avec des lipides pégylés de type noyau stérol-

PEG, céramide-PEG, PEG₂₀₀₀ tétraoléate de sorbitol ou plus généralement de type alkyl-PEG ayant au moins une chaîne alkyl procurant un ancrage hydrophobe à au moins une molécule de poly(éthylène glycol) dans l'enveloppe externe.

5 La taille de la molécule de polymère PEG greffée au phospholipide décrit plus haut a également une importance. En effet, elle va conditionner l'encombrement spatial au niveau de la surface desdites nanocapsules, et par conséquent l'accessibilité à cette surface, mais également la capacité de ces nanocapsules à échapper aux acteurs du système immunitaire.

10 Les molécules de poly(éthylène glycol) des dérivés amphiphile utilisés dans la présente invention ont de préférence une masse molaire supérieure ou égale à 1000 g/mol. Tel que mentionné précédemment, la présence de chaînes de poly(éthylène glycol) de taille inférieure à 1000 g/mol ne confère pas une protection suffisante contre l'opsonisation. Par conséquent la courte

15 chaîne de poly(éthylène glycol) de 660 g/mol présente au niveau de la molécule de tensioactif hydrophile Solutol HS15 évoquée plus haut ne pourrait conférer une protection efficace de la surface à l'égard de l'opsonisation et donc une circulation prolongée. Les molécules de PEG de

20 formule $(O-CH_2-CH_2)_n$ pouvant être utilisées dans le cadre de la présente invention appartiennent au groupe comprenant le PEG₅₀₀₀, comportant 113 unités PEG, le PEG₃₀₀₀ comportant 68 unités PEG et le PEG₂₀₀₀ comportant 45 unités PEG. Ces longues chaînes pégylées confèrent un caractère hydrophile à la surface des nanocapsules lipidiques.

25 La proportion molaire du dérivé amphiphile de PEG intégrée dans l'enveloppe desdites nanocapsules est comprise de préférence entre 0,5 et 12 mol% des molécules lipidiques composant l'enveloppe lipidique externe, de préférence entre 1 et 10 mol%. D'une manière préférentielle, on utilisera les molécules de DSPE-PEG dans une proportion molaire comprise entre 1 et 10 mol% des lipides totaux de l'enveloppe.

30 Dans un mode de réalisation préféré, on emploiera des molécules de DSPE-PEG₅₀₀₀ car leur taille (elles sont environ deux fois plus longues que les molécules de DSPE-PEG₂₀₀₀), permet d'obtenir, pour un même nombre

de molécules, une répulsion par effet stérique plus grande et un caractère furtif *in vivo* plus important. En effet, les chaînes de PEG sont constamment en mouvement à la surface de l'enveloppe lipidique, ainsi, plus elles sont longues et plus elles balayent un large espace autour des nanocapsules lipidiques, ce qui augmente l'encombrement stérique et diminue d'autant la possibilité pour des protéines d'atteindre la surface de ces nanocapsules. La capacité à échapper au phénomène d'opsonisation est donc meilleure en présence de DSPE-PEG₅₀₀₀.

Le cœur des nanocapsules conforme à l'invention est un cœur essentiellement lipidique, composé de d'esters d'acides gras et/ou de triglycérides et/ou d'huile à titre de corps gras. Les triglycérides sont avantageusement choisis parmi les triglycérides à chaîne moyenne portant de 6 à 14 atomes de carbone et/ ou des triglycérides des acides capriques ou capryliques ainsi que leurs mélanges. Plus préférentiellement, on utilisera comme mélange de corps gras composant le cœur des nanocapsules conformes à l'invention le Labrafac® CC ou le Miglyol® 812 N qui répondent aux appellations suivantes des Pharmacopées : mélange de triglycérides à chaîne moyenne (*Medium Chain Triglycerides*), huile de coco fractionnée (*Fractionated Coconut Oil*) ou triglycérides des acides capryliques et/ou capriques (*Caprylic/Capric Triglyceride*). Ces triglycérides peuvent être employés seuls ou en mélange avec d'autres esters d'acides gras ou huiles pharmaceutiques faisant également l'objet d'une approbation pour l'usage parentéral.

Les esters d'acides gras composant ledit cœur essentiellement lipidique sont avantageusement choisis parmi les acides gras à chaîne moyenne portant de 8 à 18 atomes de carbone, tels que le palmitate d'éthyle, l'oléate d'éthyle, le myristate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octyldodécyle ainsi que leurs mélanges.

Bien entendu, la composition et les proportions de chacun de ces constituants sont modulables et ajustables en fonction de la balance hydrophile/lipophile (ou HLB) que l'on veut donner au mélange. En effet, la

face interne de l'enveloppe étant de nature lipophile, il n'y aura pas d'incompatibilité entre la nature de l'enveloppe et le contenu du cœur.

Ces lipides sont sous forme liquide ou semi-liquide à température ambiante en fonction de la taille et du degré de saturation des chaînes carbonées portées par les triglycérides et les huiles constituant ledit cœur. La présence de corps gras à l'intérieur du cœur des nanocapsules selon l'invention contribue à la fois à servir de solvant aux anticancéreux transportés, mais constitue également une masse pleine qui sert au maintien et à la relative stabilité de ces nanocapsules dans l'environnement externe : que ce soit en solution dans un liquide aqueux ou à l'état sec à l'issue d'une étape de lyophilisation. Contrairement aux liposomes ou aux autres vecteurs colloïdaux ayant une membrane lipidique et un intérieur aqueux, la présence d'un contenu de corps gras assure donc une certaine stabilité (variation de la force ionique ou de la pression osmotique) aux nanocapsules selon l'invention.

Avantageusement, la surface externe de l'enveloppe lipidique externe des nanocapsules lipidiques furtives objets de la présente invention est de nature hydrophile et le cœur essentiellement lipidique est de nature lipophile.

Ainsi, l'association de lipides biodégradables et assimilables composant le cœur et l'enveloppe permet à la fois d'envisager une libération rapide des principes actifs transportés et apporte également aux nanocapsules une stabilité physique qui autorise leur lyophilisation et même leur stérilisation par passage sur filtre de 0,45 à 0,22 μm . Les nanocapsules conformes à l'invention peuvent donc être stérilisées et éventuellement conservées sous forme sèche sur de longues périodes de temps. Le nouveau vecteur conforme à l'invention offre ainsi une certaine facilité d'emploi qui en fait un produit aisément exploitable dans l'industrie.

Avantageusement, le cœur essentiellement lipidique des nanocapsules lipidiques furtives objets de la présente invention représente entre 20 à 60 %, de préférence entre 25 et 50 % en poids par rapport au poids total desdites nanocapsules.

Avantageusement, la phase aqueuse ou phase dispersante, dans laquelle les nanocapsules (ou phase dispersée) conformes à l'invention peuvent être préparées, contient initialement une certaine concentration en sels, avantageusement en NaCl. Cette concentration est comprise entre 4 et 8 %, avantageusement comprise dans l'intervalle de 4,4 à 5,2 %. A l'issue du procédé de synthèse, cette phase aqueuse peut faire l'objet d'ajout d'agents osmotiques, cryo ou lyoprotecteurs et éventuellement d'agents de conservation.

La demanderesse a en effet constaté que cette concentration en sel permettait à la fois d'obtenir une température d'inversion de phase (ou TIP) plus basse qu'en l'absence de sels, de permettre une incorporation plus massive de molécules de phospholipides couplées au PEG et enfin, de diminuer de façon conséquente la taille des nanocapsules obtenues.

Le mélange de corps gras constituant ledit cœur permet d'envisager le transport de principes actifs faiblement à fortement lipophiles et plus particulièrement de substances anticancéreuses. En effet, en fonction de la liposolubilité de chaque principe actif, la HLB sera ajustée pour permettre une dissolution complète du principe actif. La présente invention permet même le transport d'un mélange de principes actifs de solubilité différente, pour lesquels une HLB intermédiaire sera appliquée, assurant une solubilité au moins partielle de chaque anticancéreux.

Avantageusement, les nanocapsules lipidiques furtives objets de la présente invention contiennent un ou plusieurs principes actifs, notamment de nature lipophile.

Ainsi, les principes actifs anticancéreux suivants, de nature majoritairement lipophile pourront être employés, seuls ou en mélange : le paclitaxel et ses dérivés tels que le docétaxel, la camptothécine et ses dérivés tels que l'irinotécan, le topotécan ou le rubitécan, le busulfan, le chlorambucil, les phthalocyanines, les caroténoïdes, l'amphotéricine B, la dexaméthasone, et la daunomycine notamment.

Par ailleurs, des principes actifs anticancéreux de nature amphiphile tels que la cytarabine, la cyclophosphamide, le methotrexate, les dérivés

Avantageusement, la phase aqueuse ou phase dispersante, dans laquelle les nanocapsules (ou phase dispersée) conformes à l'invention peuvent être préparées, contient initialement une certaine concentration en sels, avantageusement en NaCl. Cette concentration est comprise entre 4 et 8 %, avantageusement comprise dans l'intervalle de 4,4 à 5,2 %. A l'issue du procédé de synthèse, cette phase aqueuse peut faire l'objet d'ajout d'agents osmotiques, cryo ou lyoprotecteurs et éventuellement d'agents de conservation.

La demanderesse a en effet constaté que cette concentration en sel permettait à la fois d'obtenir une température d'inversion de phase (ou TIP) plus basse qu'en l'absence de sels, de permettre une incorporation plus massive de molécules de phospholipides couplées au PEG et enfin, de diminuer de façon conséquente la taille des nanocapsules obtenues.

Le mélange de corps gras constituant ledit cœur permet d'envisager le transport de principes actifs faiblement à fortement lipophiles et plus particulièrement de substances anticancéreuses. En effet, en fonction de la liposolubilité de chaque principe actif, la HLB sera ajustée pour permettre une dissolution complète du principe actif. La présente invention permet même le transport d'un mélange de principes actifs de solubilité différente, pour lesquels une HLB intermédiaire sera appliquée, assurant une solubilité au moins partielle de chaque anticancéreux.

Avantageusement, les nanocapsules lipidiques furtives objets de la présente invention contiennent un ou plusieurs principes actifs, notamment de nature lipophile.

Ainsi, les principes actifs anticancéreux suivants, de nature majoritairement lipophile pourront être employés, seuls ou en mélange : le paclitaxel et ses dérivés tels que le docétaxel, la camptothécine et ses dérivés tels que l'irinotécan, le topotécan ou le rubitécan, le busulfan, le chlorambucil, les phthalocyanines, les caroténoïdes et la daunomycine notamment.

Par ailleurs, des principes actifs anticancéreux de nature amphiphile tels que la cytarabine, la cyclophosphamide, le methotrexate, les dérivés



fluorés tels que le 5-Fluorouracile ou le 5-fluorouridine, par exemple ou la doxorubicine notamment pourront également être transportés par les nanocapsules conformes à l'invention. Les principes actifs seront préalablement dissous dans les esters d'acides gras, les triglycérides ou dans des huiles et corps gras pharmaceutiques de grade injectable. Les solutions de principe actif ainsi réalisées pourront être directement mises en œuvre dans le procédé ou faire l'objet de dilutions ultérieures dans des mélanges de triglycérides avant leur mise en œuvre.

Enfin, on peut tout à fait prévoir le transport de tout autre type de principes actifs, et en particulier d'agents permettant le traitement des inflammations ou des foyers d'infections tissulaires. Ainsi, les nanocapsules conformes à l'invention, de par leur furtivité et la modulabilité de leur taille sont particulièrement adaptées au transport et à la délivrance de médicaments au niveau des tissus en inflammation. En effet, lors d'une inflammation, telle qu'observée dans les formes d'arthrite par exemple, les capillaires irriguant la zone inflammée voient leurs fenestrations s'élargir pour permettre un transport accru de certains éléments présents dans le sang, en particulier de protéines. Il en est de même au niveau de tissus présentant des foyers d'infection. De ce fait, même si l'accumulation à ce niveau est moins marquée qu'au niveau des tumeurs, on peut concevoir que la libération de principes actifs adaptés, dans une région proche de l'inflammation ou de l'infection par des nanocapsules conformes à l'invention permette de réduire les conséquences de telles pathologies. Ainsi, on peut tout à fait prévoir le transport par les nanocapsules conformes à l'invention de substances anti-inflammatoires telles que l'ibuprofène, les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou les corticoïdes par exemple ainsi que les antibiotiques, les antalgiques et les anti-infectieux.

Le cœur des nanocapsules conformes à l'invention est donc composé d'une phase grasse dont la composition variable permet d'ajuster la capacité des nanocapsules à solubiliser un anticancéreux donné.

fluorés tels que le 5-Fluorouracile ou le 5-fluorouridine, par exemple ou la doxorubicine notamment pourront également être transportés par les nanocapsules conformes à l'invention. Les principes actifs seront préalablement dissous dans les esters d'acides gras, les triglycérides ou dans des huiles et corps gras pharmaceutiques de grade injectable. Les solutions de principe actif ainsi réalisées pourront être directement mises en œuvre dans le procédé ou faire l'objet de dilutions ultérieures dans des mélanges de triglycérides avant leur mise en œuvre.

Enfin, on peut tout à fait prévoir le transport de tout autre type de principes actifs, et en particulier d'agents permettant le traitement des inflammations ou des foyers d'infections tissulaires. Ainsi, les nanocapsules conformes à l'invention, de par leur furtivité et la modulabilité de leur taille sont particulièrement adaptées au transport et à la délivrance de médicaments au niveau des tissus en inflammation. En effet, lors d'une inflammation, telle qu'observée dans les formes d'arthrite par exemple, les capillaires irriguant la zone inflammée voient leurs fenestrations s'élargir pour permettre un transport accru de certains éléments présents dans le sang, en particulier de protéines. Il en est de même au niveau de tissus présentant des foyers d'infection. De ce fait, même si l'accumulation à ce niveau est moins marquée qu'au niveau des tumeurs, on peut concevoir que la libération de principes actifs adaptés, dans une région proche de l'inflammation ou de l'infection par des nanocapsules conformes à l'invention permette de réduire les conséquences de telles pathologies. Ainsi, on peut tout à fait prévoir le transport par les nanocapsules conformes à l'invention de substances anti-inflammatoires telles que l'ibuprofène, les corticoïdes tels que la dexaméthasone, ainsi que les antibiotiques, les antalgiques et les anti-infectieux tels que l'amphotéricine B.

Le cœur des nanocapsules conformes à l'invention est donc composé d'une phase grasse dont la composition variable permet d'ajuster la capacité des nanocapsules à solubiliser un anticancéreux donné.

1) Traitement des tumeurs solides et circulantes

La présente invention est utilisable en premier lieu dans des thérapies anticancéreuses par voie sanguine.

5 les nanocapsules conformes à l'invention pourront faire l'objet d'une utilisation pour le traitement des tumeurs solides chez l'Homme.

Par ailleurs, pour le traitement des tumeurs circulantes de type leucémie ou lymphome. En effet, tel qu'il a été mentionné précédemment, le ciblage de cellules tumorales circulantes ne peut être obtenu que si les
10 particules du système colloïdal présentent des caractéristiques de furtivité susceptibles de favoriser les rencontres avec les cellules tumorales avant toute capture par les cellules du SPM circulantes ou du foie. Ainsi, les nanocapsules conformes à l'invention sont particulièrement adaptées pour le traitement des tumeurs circulantes.

15 Ces nanocapsules pourraient également avoir des capacités de ciblage actif au moyen du couplage de ligands ayant une affinité spécifique pour des molécules de type récepteur se trouvant à la surface des cellules cancéreuses.

Avantageusement, les nanocapsules lipidiques furtives objets de la
20 présente invention portent à leur surface des ligands spécifiques leur conférant des capacités de ciblage actif de cellules ayant des récepteurs pour ces ligands, notamment les cellules tumorales.

De préférence, le ligand sera choisi pour ne pas stimuler, ou légèrement stimuler, les phénomènes d'élimination des particules.

25 Avantageusement, ledit ligand est de type saccharide ou oligosaccharide, vitamine ou encore de type oligopeptide, fragment d'anticorps ou anticorps monoclonal.

Les ligands de type saccharide ou oligosaccharide, vitamine (folate, riboflavine) et même de type oligopeptide, fragment d'anticorps ou anticorps
30 monoclonal, pourront être avantageusement utilisés. Ainsi, lesdits ligands seront préalablement couplés à l'extrémité réactive de molécules de type phospholipide pégylé activé ou tout autre lipide susceptible de comprendre

une partie hydrophobe, pouvant s'ancrer dans la surface des nanocapsules, une chaîne hydrophile de type poly(éthylène glycol) et une fonction chimique réactive au bout de cette chaîne hydrophile. Ces ligands, une fois fixés au bout de ces chaînes seront alors introduits de manière préférentielle par la technique de post-insertion telle que décrite plus loin. Le procédé de post-insertion rend en effet possible l'introduction d'un type de ligand particulier ou de ligands de natures différentes présentant diverses spécificités susceptibles de conférer un ensemble de propriétés particulières au vecteur conforme à l'invention.

2) Traitement des tissus inflammés (arthrite notamment) et infectés

On peut également prévoir d'utiliser les nanocapsules conformes à la présente invention dans le but de traiter des inflammations et/ou des infections des tissus, notamment chez l'Homme. En effet, comme cela a été décrit plus haut, lors des inflammations tissulaires ou des infections, les capillaires irriguant la zone sujette à l'inflammation font l'objet d'une perméabilité accrue. Cette perméabilité temporaire peut être exploitée au même titre que pour le traitement des tumeurs solides en utilisant le phénomène d'extravasation pour apporter au tissu inflammé des substances bio actives capables de réduire ou d'éliminer les causes et/ou les conséquences de l'inflammation. Ainsi, on peut prévoir notamment le transport par les nanocapsules conformes à l'invention de principes actifs destinés à l'atténuation de l'inflammation comme des anti-inflammatoires, des antalgiques ou des antibiotiques par exemple. Dans le cas de l'arthrite par exemple qui correspond à une inflammation de certaines articulations, on procédera préférentiellement à une injection intra articulaire des nanocapsules conformes à l'invention. En effet, on favorise ainsi le ciblage du vecteur directement sur son site d'action et on limite par ailleurs la déperdition par dilution des nanocapsules dans l'ensemble de la circulation sanguine. Par ailleurs, les propriétés de furtivité des nanocapsules conformes à l'invention devraient leur permettre de ne pas être reconnues et

éliminées des sites inflammatoires par le grand nombre de cellules du SPM et du systèmes immunitaire présentes sur ces lieux.

La présente invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques comprenant les nanocapsules selon la présente invention
5 qui contiennent un ou plusieurs principes actifs. Ces compositions pharmaceutiques sont avantageusement sous la forme de suspension aqueuse colloïdale contenant lesdites nanocapsules.

Un tel vecteur peut être administré par voie parentérale et notamment par voie intraveineuse, intra artérielle, intra péritonéale, et intra musculaire,
10 mais également, on peut prévoir de l'injecter par voie sous-cutanée. En effet, la voie sous-cutanée permettra d'atteindre les vaisseaux lymphatiques qui pourraient assurer l'accumulation des nanocapsules selon l'invention au niveau des ganglions lymphatiques. Cette voie d'accès est donc particulièrement importante pour le traitement des affections ganglionnaires
15 et plus particulièrement des tumeurs ganglionnaires.

3) Détoxification

Avantageusement, les nanocapsules lipidiques objets de la présent
20 invention peuvent être utilisées pour la capture de molécules hydrophobes présentes dans la circulation sanguine suite à une intoxication.

A la suite d'intoxications aiguës à un principe actif de nature hydrophobe des nanocapsules lipidiques furtives non chargées en actif pourraient être administrées par voie intraveineuse. Ainsi, grâce à leur temps
25 de circulation prolongé et à leur cœur lipidique hydrophobe, les nanocapsules conformes à l'invention pourraient capter les principes actifs présents dans la circulation sanguine de manière à en diminuer la concentration libre et par conséquent leur toxicité. Par la suite, ces principes actifs seraient relargués progressivement avec la dégradation du vecteur à
30 des concentrations inférieures aux concentrations libres toxiques.

4) Filtration stérilisante

Enfin, les nanocapsules selon la présente invention présente l'avantage de pouvoir être stérilisées par filtration stérilisante sur filtre d'un diamètre de 0,45 μ m et même de 0,22 μ m, étape qui peut avoir lieu directement après l'étape de trempe finale du procédé décrit ci-après. En effet, la demanderesse a constaté que les nanocapsules selon l'invention étaient suffisamment solides en suspension pour être passées sur ce type de filtre, sans subir d'altération majeure et surtout sans perdre leur capacité de furtivité et de biodégradabilité. Cette caractéristique permet un emploi facile et sécurisé desdites nanocapsules pour l'usage parentéral, ce qui en fait un vecteur de choix pour une utilisation massive, industrielle ou hospitalière par exemple.

5) Utilisation sous forme sèche/filtration

Les nanocapsules conformes à l'invention peuvent avantageusement être lyophilisées puis reconstituées sous forme de suspension colloïdale. Elles peuvent ainsi être conservées facilement pendant des périodes de temps prolongées. La reconstitution d'une suspension de nanocapsules selon l'invention à partir d'une forme sèche peut en effet s'effectuer extemporanément, juste avant emploi. Une telle lyophilisation peut s'opérer directement après une étape de filtration stérilisante telle que décrite ci-dessus.

La lyophilisation desdites nanocapsules consiste à éliminer l'eau des préparations par un phénomène de sublimation. On ajoute alors à la suspension de nanocapsules à lyophiliser une quantité adéquate (environ 5% m/m) d'un agent cryoprotecteur ou lyoprotecteur tel que le Mannitol ou le Tréhalose par exemple. Après dissolution totale de ces composés, les suspensions choisies subissent une première étape de congélation rapide aux alentours de -50 °C. Puis ces suspensions sont lyophilisées par passage direct de l'eau sous forme vapeur à basse température sous pression

réduite. Les nanocapsules sous forme sèche pourraient alors être stockées sous forme stérile pour de longues périodes de temps avant emploi.

6) Autres administrations

5

On peut prévoir d'utiliser comme vecteur de principes actifs, les nanocapsules conformes à l'invention pour traiter d'autres types d'affections que les tumeurs ou les inflammations. En effet, une des qualités de ce vecteur colloïdal est sa faculté à échapper au système immunitaire de l'hôte et en particulier aux cellules du SPM telles que les macrophages. On peut donc prévoir d'utiliser les nanocapsules furtives de l'invention dans des zones de l'organisme où l'utilisation de vecteurs conventionnels est particulièrement inadaptée. De telles zones riches en macrophages existent au niveau des alvéoles pulmonaires et des ganglions lymphatiques par exemple. On peut ainsi envisager d'administrer ledit vecteur selon des voies pour lesquelles la phagocytose et/ ou l'opsonisation constituent une limite à l'efficacité de la forme pharmaceutique.

15

Procédés de préparation des nanocapsules

20

Les nanocapsules constituant le vecteur colloïdal furtif conforme à l'invention peuvent être avantageusement synthétisées par deux procédés. Le premier procédé est dit classique car couramment utilisé pour la synthèse de nanocapsules lipidiques. Le second procédé a été mis au point par la demanderesse et est adapté aux nanocapsules selon l'invention. Il permet notamment d'obtenir des taux d'incorporation en phospholipides "pégylés" supérieurs à ceux obtenus par le procédé classique et offre également la possibilité d'incorporer des phospholipides couplés à des ligands permettant d'assurer un ciblage actif. Ces deux procédés sont détaillés successivement ci-après.

25

30

1) PROCÉDE DE SYNTHÈSE DES NANOCAPSULES CLASSIQUE

Le procédé permettant la synthèse du vecteur colloïdal furtif conforme à l'invention est avantageusement exempt de tout solvant organique. Par ailleurs, c'est un procédé simple et relativement rapide qui ne nécessite pas de matériel particulier. En outre, ce procédé ne met en œuvre que des composés biodégradables approuvés pour usage parentéral et naturellement assimilables par l'organisme, par un phénomène de "biorésorption" notamment. Enfin, le procédé conforme à l'invention permet la synthèse de nanocapsules de diamètre défini et choisi par l'utilisateur dans une gamme de diamètres variant de 40 à 200 nm. C'est l'ajustement de la taille des nanocapsules synthétisées qui va permettre d'adapter le vecteur aux différents types de tumeurs à traiter.

On procède tout d'abord à la constitution d'une émulsion huile/eau à partir d'eau, de sel, du tensioactif hydrophile, du tensioactif lipophile, des corps gras nécessaires à la constitution du cœur desdites nanocapsules, des molécules de lipides couplées aux molécules de PEG et du ou des principes actifs destinés à être transportés par les nanocapsules selon l'invention. Le principe actif sera préalablement dissout dans la phase grasse huileuse devant constituer le cœur des nanocapsules conformes à l'invention.

La première étape consiste donc à peser l'ensemble des constituants, à les chauffer à une température supérieure à la température de fusion du tensioactif lipophile sous agitation douce, par exemple magnétique, jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène huile/eau. Le mélange est ainsi porté dans un premier temps à 65°C lorsque le tensioactif lipophile est représenté par l'HSPC.

Puis, on provoque l'inversion de phase de cette émulsion huile/eau pour la transformer en une émulsion eau/huile. Pour ce faire, on augmente la température du mélange jusqu'à une température T2 supérieure à la température d'inversion de phase (TIP) du mélange ainsi constitué. On diminue alors la température du mélange jusqu'à une température T1.

L'inversion de phase peut être éventuellement suivie par l'annulation de la conductivité de la formulation lorsque l'émulsion eau/huile se forme,

mais peut être généralement visible à l'œil nu tel que décrit ci-dessous. T1 est une température à laquelle la conductivité est au moins égale à 90 – 95 % de la conductivité mesurée à 20°C. T2 est la température à laquelle la conductivité s'annule.

5 On répète cette opération en effectuant au moins un cycle de modification de température autour de la zone d'inversion de phase entre T1 et T2 jusqu'à l'apparition d'une solution translucide. En effet, l'organisation du système sous forme de nanocapsules se traduit visuellement par un changement d'aspect du système initial qui passe de blanc-opaque à blanc-translucide. Ce changement se produit lorsque la température descend en
10 dessous de la température d'inversion de phase (TIP). Cette température est située généralement entre 6 à 15°C en dessous de la TIP.

Le nombre de cycles appliqués à l'émulsion dépend de la quantité d'énergie nécessaire pour former les nanocapsules. L'inversion de phase
15 entre l'émulsion huile/eau et l'émulsion eau/huile se traduit par une diminution de la conductivité quand la température augmente jusqu'à ce qu'elle s'annule. La température moyenne de la zone d'inversion de phase correspond à la température d'inversion de phase (TIP).

On peut alors effectuer la trempe de l'émulsion huile/eau, c'est à dire
20 son refroidissement brutal pour obtenir des nanocapsules stables. Cette opération s'effectue sous agitation magnétique en diluant l'émulsion entre 3 et 10 fois à l'aide d'eau désionisée à 2°C +/- 1°C jetée dans l'émulsion fine. Cette étape de trempe permet de faire passer les nanocapsules de la forme émulsion pour laquelle les lipides qui les composent sont fluides, à la forme
25 suspension pour laquelle ils sont dans un état plus figé donc structurellement très stables. Les particules ainsi obtenues sont maintenues sous agitation pendant 5 minutes. Dans le cas d'une application industrielle, il peut être envisagé de procéder à un refroidissement brutal de la préparation en la faisant circuler dans un système d'échangeurs thermiques par exemple.
30 Dans ce cas particulier, on évite la dilution de la préparation.

Avantageusement, la phase grasse est le Labrafac® cc, le tensioactif lipophile est le HSPC (Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine) et le

tensioactif hydrophile est le Solutol® HS15. Le dérivé amphiphile du PEG est le phospholipide pégylé DSPE-PEG₂₀₀₀ ou ₅₀₀₀. Dans ces conditions, T1 = 60°C, T2= 85°C et le nombre de cycles est égal à 3.

Au niveau des constituants de l'enveloppe des nanocapsules, le pourcentage molaire du tensioactif lipophile de nature lipidique est compris entre 5 et 30 mol%. Il est compris entre 60 et 90 mol% pour le tensioactif de nature hydrophile et compris entre 0,5 et 5mol% pour le phospholipide pégylé.

Un exemple avantageux du pourcentage molaire des différents constituants de l'enveloppe lipidique externe desdites nanocapsules peut être le suivant :

- HSPC : **15,46** mol%
- Solutol® HS15 : **81,2** mol%
- DSPE-PEG₂₀₀₀ : **3,34** mol%

Dans cet exemple, la concentration en sel de l'émulsion initiale est de 4,4% (m/m), la masse de Labrafac® cc constituant le cœur des nanocapsules lipidiques représente 44 % (m/m) de la totalité des constituants de nature lipidique ou tensioactifs présents dans la préparation. Cet ensemble de constituants sera par la suite désigné sous le terme de lipides totaux (composants autres que l'eau et le chlorure de sodium), ce terme inclut notamment le phospholipide pégylé. Le rapport entre les constituants de la surface lipidique externe (mentionnés ci-dessus) et les lipides totaux est donc de 55 %.

D'une façon générale, plus le rapport massique entre les lipides composant l'enveloppe externe desdites nanocapsules et les lipides totaux les constituant est élevé, plus la taille des nanocapsules est petite. Ainsi, on peut aisément moduler la taille des nanocapsules selon l'invention, au moment de leur synthèse en choisissant un rapport massique entre les lipides de l'enveloppe et les lipides totaux adéquat.

Inversement, la taille des particules augmente quand la proportion en lipides constituant le cœur de celles-ci augmente.

Par ailleurs, la taille des particules diminue quand la proportion en agent tensioactif hydrophile augmente et quand la proportion en agents tensioactifs (hydrophile et lipophile) augmente. L'agent tensioactif entraîne une diminution de la tension interfaciale et donc une stabilisation du système ce qui favorise l'obtention de petites particules. En effet, plus la tension interfaciale est faible, plus la suspension de nanocapsules lipidiques dans une solution aqueuse est stable. Pour des quantités fixées en tensioactifs hydrophile et lipophile ainsi qu'en esters d'acides gras, l'ajout de quantités croissantes de lipides pégylés se traduit par une augmentation de la taille des particules. Il est possible d'obtenir différentes gammes de tailles et différentes teneurs en phospholipide pégylé en choisissant des quantités de Solutol® HS15 et de DSPE-PEG données (se reporter à la figure 1 de l'exemple 4).

Selon un mode de réalisation préférée, la phase grasse est le Labrafac® CC, le tensioactif lipophile de nature lipidique est le HSPC (Northern Lipids), le tensioactif hydrophile non ionique est le Solutol® HS15 et le lipide couplé aux molécules de PEG est le DSPE-PEG₂₀₀₀. Ces composés présentent les caractéristiques suivantes :

- Le Labrafac® CC (Gattefossé, Saint-Priest, France). Il s'agit d'une huile composée de triglycérides à chaîne moyenne des acides capryliques et capriques (C₈ et C₁₀). Sa densité est de 0,930 à 0,960 à 20°C. Son indice HLB est de l'ordre de 1. Sa composition est identique au Miglyol® 812N (Sasol, Allemagne). Le Labrafac® CC entre dans la composition de préparations pour nutrition parentérale.

- Le Solutol® HS15 (BASF, Ludwigshafen, Allemagne). Il s'agit d'un 12-hydroxystéarate de poly(éthylène glycol)-660. Il joue donc le rôle d'agent tensioactif hydrophile dans la formulation. Il est utilisable par voie injectable (chez la souris en IV DL₅₀ > 3,16 g/kg, chez le rat 1,0 < DL 50 < 1,47 g /kg).

- Le DSPE-PEG₂₀₀₀ (Northern Lipids Inc., Vancouver, Canada). Il s'agit du N-(carbamoyl-méthoxy poly(éthylène glycol) 2000)-1,2-distéaroyl-sn-3-phosphoéthanolamine sous forme de sel de sodium. Il confère aux

nanocapsules lipidiques leur caractère furtif. Les longues chaînes de poly(éthylène glycol) permettent de protéger la surface des nanocapsules par leur effet stérique en empêchant les protéines de la circulation sanguine de s'y déposer (opsonisation). Il est utilisable par la voie injectable et entre dans la préparation liposomale Doxil® (Alza, Mountain View, Etats-Unis d'Amérique).

La phase aqueuse de l'émulsion initiale huile/eau peut également contenir 4 à 8 % d'un sel comme le chlorure de sodium. La modification de la concentration en sel entraîne un déplacement de la zone d'inversion de phase. Plus la concentration en sel augmente et plus la température d'inversion de phase est basse. Ce phénomène est intéressant pour l'encapsulation de principes actifs thermosensibles hydrophobes. Leur incorporation peut alors se faire à une température plus faible.

Le diamètre des nanocapsules est avantageusement ajusté par un ajustement des proportions en sel, en tensioactif hydrophile et de la pureté du tensioactif lipophile dans le mélange de départ du procédé de synthèse.

2) PROCEDE DE SYNTHESE DES NANOCAPSULES FURTIVES PAR POST-INSERTION

Les nanocapsules lipidiques furtives objets de la présente invention sont avantageusement préparées selon un procédé par post-insertion.

Ce procédé comprend une étape de préformation de nanocapsules dépourvues de dérivé amphiphile du poly(éthylèneglycol), puis une étape de post-insertion desdits dérivés amphiphiles du poly(éthylèneglycol) à la surface de ces nanocapsules.

Selon ce procédé, ladite étape de préformation comprend avantageusement la synthèse de nanocapsules dépourvues du dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) selon l'inversion de phase d'une émulsion huile/eau provoquée par plusieurs cycles de montée et descente en température, tel que décrit précédemment au niveau du procédé classique.

Le procédé mis au point par la demanderesse est également exempt de tout solvant organique et permet d'obtenir un meilleur rendement d'incorporation de phospholipides "pegylés" à la surface des nanocapsules conformes à l'invention.

5 Par exemple, on peut obtenir des nanocapsules dont la proportion molaire en DSPE-PEG par rapport aux lipides de l'enveloppe sera supérieure à 5 mol% et préférentiellement de l'ordre de 10 mol%. Une telle proportion confère aux nanocapsules selon l'invention de bonnes qualités de furtivité. Or, l'obtention de telles proportions est difficilement réalisable selon
10 le procédé de synthèse classique décrit ci-dessus. Par ailleurs, le procédé de synthèse par préformation de nanocapsules sans PEG suivi de l'incorporation postérieure de DSPE-PEG par insertion permet d'ajuster précisément la taille des nanocapsules, et ainsi de les adapter au type de tumeurs à traiter par un ajustement de la proportion et de la longueur des
15 chaînes hydrophiles du dérivé amphiphile. Outre l'insertion de molécules de DSPE-PEG en plus grande proportion, il est envisageable par cette technique de post-insertion d'incorporer des dérivés de phospholipides comportant des ligands au bout d'une chaîne pégylée. Ces ligands pourront conférer aux nanocapsules conformes à l'invention des propriétés de ciblage
20 actif et spécifique de cellules d'intérêt (tumeurs solides et circulantes). Ce procédé de post-insertion convient particulièrement à des molécules thermosensibles puisqu'il est réalisé à une température qui ne dépasse pas 60°C.

Par exemple, on réalise au préalable des nanocapsules à base
25 d'HSPC et conformément au procédé décrit ci-dessus, mais dépourvues de DSPE-PEG.

Ladite étape de post-insertion comprend avantageusement une première étape de co-incubation des nanocapsules préformées en présence du dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol), puis une seconde étape dite
30 de trempe au cours de laquelle le mélange dérivé amphiphile du poly(éthylèneglycol)/nanocapsules préformées ainsi obtenu est brusquement refroidit pour atteindre une température comprise entre 0 et 5°C.

Par exemple, on ajoute de l'eau à la préparation contenant les nanocapsules dépourvues de DSPE-PEG décrites ci-dessus de manière à la porter à un volume précis dans une fiole jaugée. Ainsi la concentration précise des lipides en mg/ml est connue et peut servir de base au calcul pour les quantités de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou ₅₀₀₀, par exemple, à ajouter de manière à atteindre par exemple 6 mol% par rapport au total des lipides (DSPE-PEG compris) entrant dans la composition de l'enveloppe externe des nanocapsules lipidiques de l'invention. Avantageusement, la préparation de nanocapsules et les solutions micellaires de DSPE-PEG sont par la suite portées et maintenues séparément à 60°C pendant une durée de 15 minutes.

L'étape de co-incubation du mélange dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol)/nanocapsules préformées se fait à une température très légèrement supérieure à la température de transition de phase gel/liquide dudit tensioactif lipophile de nature lipidique mais inférieure à la température d'inversion de phase du mélange dérivé amphiphile du poly(éthylèneglycol)/nanocapsules préformées afin d'éviter toute désorganisation du système en raison du phénomène d'inversion de phase. Si on reprend l'exemple précédent, on constate qu'à 60°C la surface des nanocapsules lipidiques est beaucoup plus fluide et permet l'insertion de phospholipides supplémentaires. On introduit alors le volume requis de solution micellaire de DSPE-PEG dans la préparation de nanocapsules. On laisse incubé pendant 1h30 à 60°C en agitant vigoureusement tous les quarts d'heure. A l'issue de cette période d'incubation, les préparations sont plongées pendant une minute dans un bain de glace de manière à figer brutalement l'enveloppe des nanocapsules et d'y piéger les molécules de DSPE-PEG insérées.

Ce procédé de post-insertion permet d'obtenir des nanocapsules conformes à l'invention dont la teneur en DSPE-PEG est plus élevée que celle qu'il est possible d'atteindre par la méthode classique. En effet, les nanocapsules ainsi préparées présentent *in vivo* un caractère furtif très

supérieur à celui qu'il est possible d'obtenir avec les nanocapsules réalisées selon la méthode classique.

Il est également possible de procéder à la post-insertion de DSPE-PEG à des températures plus basses (37—50°C) mais sur des temps d'incubation plus longs. Ainsi, cette méthode d'insertion à basse température peut convenir pour l'incorporation de dérivés de phospholipides pégylés ayant à l'extrémité de la chaîne PEG des groupements thermosensibles tels que certains oligopeptides et protéines par exemple. Ces derniers composés pourraient servir de groupements orienteurs pour la réalisation de nanocapsules conformes à l'invention mais permettant le ciblage actif de cellules tumorales.

En outre, ledit procédé de post-insertion permet d'introduire, en plus des molécules de DSPE-PEG, des phospholipides activés de type PDP-PEG₂₀₀₀-DSPE (PyridylDithioPropionylamino-PEG₂₀₀₀-DSPE) ou MPB-PEG₂₀₀₀-DSPE (p-(Maleimidophenyl)butaroylamino-PEG₂₀₀₀-DSPE) (Northern Lipids Inc., Vancouver, Canada) qui comportent des fonctions réactives à l'extrémité des chaînes pégylées. Ces fonctions réactives permettent le couplage, une fois les nanocapsules selon l'invention obtenues, de composés de nature peptidique comportant des groupements thiols tels que des oligopeptides ou des protéines de type anticorps afin de leur conférer des propriétés de ciblage actif.

FIGURES

Il sera fait référence aux figures suivantes dans les exemples décrits ci-après:

- **Figure 1** : Evolution de la taille de nanocapsules réalisées à partir de HSPC en fonction du pourcentage molaire en DSPE-PEG₂₀₀₀
- **Figure 2** : Evolution de la taille de nanocapsules réalisées à partir de HSPC, dépourvues de DSPE-PEG en fonction du rapport Lipides de la surface/total des lipides

- **Figure 3** : Evolution de la taille de nanocapsules pour différentes formulations obtenues par le procédé de post-insertion
- **Figure 4** : Comparaison de profils sanguins de formulations de nanocapsules réalisées à partir de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀
- **Figure 5** : Comparaison du caractère furtif de différentes formulations de nanocapsules réalisées à partir de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀ ou de nanocapsules réalisées selon l'art antérieur
- **Figure 6** : Comparaison du caractère furtif de différentes formulations de nanocapsules réalisées par le procédé classique ou par le procédé de post-insertion

A) EXEMPLES DE REALISATION DE NANOCAPSULES FURTIVES SELON LE PROCEDE CLASSIQUE

Dans les exemples qui suivent :

% massique= pourcentage massique par rapport au poids total de la nanocapsule

Mol% = pourcentage molaire par rapport à l'enveloppe externe de la nanocapsule

% m/env. = pourcentage massique par rapport au poids de l'enveloppe externe de la nanocapsule

Exemple 1 : Préparation comportant du DSPE-PEG₂₀₀₀

Réalisation d'une préparation comportant du DSPE-PEG₂₀₀₀ à 2,86 mol% pour un total d'environ 1 gramme de lipides, selon le procédé classique.

On introduit dans un flacon à scintillation de 20 ml les constituants nécessaires à la synthèse des nanocapsules conformes à l'invention avec les quantités présentées dans le tableau 1.

Tableau 1

	masse (mg)	% massique	Nombre de mol	Mol %	% m/env.
HSPC	75	1,50%	9,843E-05	16,98%	13,25%
DSPE-PEG	46	0,92%	1,658E-05	2,86%	8,13%
Solutol HS15	445	8,90%	4,645E-04	80,15%	78,62%
Labrafac	504	10,08%			
NaCl	220	4,40%			
eau	3710	74,20%			

Total lipides	1070
Env. / Total	52,90%

Total 5000 100,00%

D'une façon générale, on tolère lors des pesées des variations maximales (par rapport aux valeurs cibles) de $\pm 1,5\%$ pour la lécithine et le DSPE-PEG de $\pm 0,2$ à $0,5\%$ pour le tensioactif hydrophile (Solutol® HS15) et les triglycérides et de $\pm 3\%$ pour le sel. La quantité d'eau introduite est au minimum égale à la valeur indiquée et au maximum supérieure de 2% à la valeur indiquée. En effet, comme cela a été expliqué précédemment, les tailles des nanocapsules obtenues dépendent principalement du rapport entre la somme des lipides constituant l'enveloppe des particules et la masse totale des lipides (*Enveloppe/Total*).

Après les pesées la température est montée progressivement jusqu'à 60°C et l'agitation est maintenue pendant quelques minutes durant lesquelles on s'assure de la désintégration des agrégats de lécithine ou de DSPE-PEG. Puis une montée en température est effectuée jusqu'à $80-85^{\circ}\text{C}$. Par la suite, le flacon est transféré sur une plaque non chauffée et on laisse la température descendre, toujours sous agitation, jusqu'à 60°C . Puis on peut entreprendre trois cycles de montée en température jusqu'à 80°C et de descente jusqu'à 60°C . Au cours de la deuxième montée en température il est possible d'observer le phénomène d'inversion de phase (au-dessous de

la Température d'Inversion de Phase (TIP) la solution est translucide puis devient opaque et d'aspect crémeux au-dessus de la TIP).

A la fin du troisième cycle une trempe est effectuée par l'ajout d'un volume d'eau froide à 1°C (12,5 ml) lorsque la température tombe de 10°C en dessous de la température à laquelle s'est produite le changement d'aspect, telle que relevée lors de la deuxième et de la troisième montée en température. Suite à la trempe, l'agitation est maintenue pendant une durée de 5 minutes. Dans l'exemple cité, la température à laquelle s'est produite le changement d'aspect est de 75°C, la température maximale à laquelle a été portée la préparation est de 82°C et la trempe a été effectuée à 62°C.

Par la suite une analyse du profil de distribution de tailles par diffusion dynamique de la lumière peut être réalisée après filtration de la préparation sur un filtre de porosité 0,2 µm. La préparation citée en exemple permet l'obtention de nanocapsules conformes à l'invention d'une taille de $87,5 \pm 14$ nm. La teneur en DSPE-PEG₂₀₀₀ est de 2,86 mol% par rapport à l'ensemble des constituants de la surface. Les autres proportions ont été précédemment reportées dans le tableau 1.

La proportion maximale de DSPE-PEG₂₀₀₀ qu'il a été possible d'atteindre par cette méthode classique de préparation est de 3,34 mol%. L'ajout d'une quantité supplémentaire de ce phospholipide pégylé se traduit par l'instabilité des préparations obtenues suite à la trempe finale.

Exemple 2 : préparation comportant du DSPE-PEG₅₀₀₀

Réalisation d'une préparation comportant du DSPE-PEG₅₀₀₀ à 1,41 mol% pour un total d'environ 0,6 grammes de lipides, selon le procédé classique.

Le mode opératoire est identique à celui décrit dans l'exemple précédent, à l'exception des quantités engagées qui sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2

	masse (mg)	% massique	Nombre de moles	mol%	% m/env.				
HSPC	37,5	1,50%	4,921E-05	15,54%	11,89%				
DSPE-PEG	25,8	1,03%	4,461E-06	1,41%	8,18%				
Solutol HS15	252	10,08%	2,630E-04	83,05%	79,92%				
Labrafac	252	10,08%	<table><tr><td>Total lipides</td><td>567,3</td></tr><tr><td>Env. / Total</td><td>55,58%</td></tr></table>			Total lipides	567,3	Env. / Total	55,58%
Total lipides	567,3								
Env. / Total	55,58%								
NaCl	116	4,64%							
eau	1816,7	72,67%							

Total 2500 100,00%

5 Pour cette préparation, le changement d'aspect opaque/translucide s'est produit vers 72°C, la température maximale atteinte au cours des cycles est de 81°C et la trempe a été effectuée en dessous de 65°C avec un volume de 6 ml d'eau glacée.

La taille moyenne des nanocapsules obtenues par diffusion dynamique de la lumière est de $63,2 \pm 9,83$ nm après filtration de la préparation sur un filtre de porosité 0,2 μ m.

10 La proportion maximale de DSPE-PEG₅₀₀₀ qu'il a été possible d'atteindre par cette méthode classique de préparation est de 1,49 mol%.

Ainsi, la quantité de phospholipides incorporés par la méthode classique est d'autant plus limitée que ces molécules présentent des chaînes de PEG plus longues.

15

20

B) Exemples de fabrication de nanocapsules selon l'invention par post-insertion

Exemple 3 : Réalisation de nanocapsules selon le procédé d'insertion de DSPE-PEG à des Nanocapsules préformées.

Le tableau 3 donne un exemple de quantités des différents constituants, permettant l'obtention de formulations de nanocapsules lipidiques ayant des diamètres se situant autour de 80 nm par la technique d'insertion de DSPE-PEG dans des nanocapsules préformées.

La réalisation de la préparation mère de nanocapsules préformées, sans DSPE-PEG, se fait selon le procédé classique. Les quantités introduites sont reportées dans le tableau 3. Après la trempe, la préparation est transférée dans une fiole jaugée et le volume est complété à 25 ml avec de l'eau distillée.

Tableau 3

	masse (mg)	% massique	Nombre de moles	mol%	% m/env.
HSPC	75	1,50%	9,843E-05	17,48%	14,42%
DSPE-PEG	0	0,00%	0,000E+00	0,00%	0,00%
Solutol HS15	445	8,90%	4,645E-04	82,52%	85,58%
Labrafac	504	10,08%			
NaCl	220	4,40%			
eau	3756	75,12%			
				Total lipides	1024
				Env. / Total	50,78%

Total 5000 100,00%

Des solutions micellaires de DSPE-PEG₂₀₀₀ et DSPE-PEG₅₀₀₀ ont été préalablement réalisées par pesée de 75 mg de phospholipides "pégylés", ajout d'une quantité suffisante d'eau distillée pour effectuer la dissolution et

complétion du volume, après dissolution totale, jusqu'à un volume total précis de 5 ml.

On répartit alors des volumes de 2 ml de préparation mère dans des tubes à hémolyse bouchés que l'on place dans un bain-marie à 60°C. On place également au bain-marie les solutions micellaires. Les préparations de nanocapsules lipidiques et les solutions micellaires de DSPE-PEG sont pré-incubées séparément à 60°C pendant 15 minutes. Au bout de ce temps on ajoute les volumes requis pour obtenir une proportion théorique de 6 mol% en phospholipides associés aux molécules de PEG au niveau de l'enveloppe des nanocapsules. Ainsi, avec les volumes et les concentrations des solutions micellaires indiquées ci-dessus, on ajoute 532 µl de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 1108 µl de DSPE-PEG₅₀₀₀. Un témoin est également réalisé en ajoutant 800 µl d'eau chaude.

Après ces ajouts les solutions sont laissées pendant 1h30 à 60°C et agitées au vortex tous les quarts d'heure. Au bout de cette période d'incubation, les préparations sont plongées dans un bain de glace.

Les tailles des nanocapsules lipidiques obtenues sont reportées dans le tableau 4

Tableau 4

Préparation	Taille nanocapsules (nm)
Préparation mère non incubée	69 ± 12,9
Témoin chauffé	69,9 ± 14,2
DSPE-PEG ₂₀₀₀	77,9 ± 14
DSPE-PEG ₅₀₀₀	78,4 ± 13

La préparation témoin, incubée dans les mêmes conditions présente des particules ayant une taille proche de celles de la préparation mère non incubée à 60°C. Les préparations ayant été incubées en présence de DSPE-PEG présentent une augmentation sensible du diamètre moyen des

particules, suggérant l'insertion des phospholipides "pégylés" à la surface des nanocapsules.

C) Influence de divers paramètres sur la taille des nanocapsules conformes à l'invention

Exemple 4 : Contrôle de la taille de nanocapsules réalisées selon le procédé classique

Les préparations sont réalisées conformément à la méthode classique telle que décrite au niveau de l'exemple 1. Les préparations sont réalisées avec une quantité de lipides se situant autour de 1 g. La figure 1 représente l'évolution de la taille des nanocapsules en fonction de la proportion de DSPE-PEG₂₀₀₀ ajoutée pour des quantités en tensioactif hydrophile, Solutol HS15, fixées respectivement à 414 mg ($413,5 \pm 0,50$), 446 mg ($445,85 \pm 0,01$) ou 504 mg ($504,4 \pm 0,27$). Les quantités de HSPC, Labrafac[®] cc et NaCl sont maintenues constantes pour toutes les préparations, respectivement à 76 mg, 504,5 mg et 220 mg.

D'une manière générale la taille augmente pour des quantités de Solutol HS15 décroissantes. Dans une même série, pour une quantité donnée de Solutol HS15, la taille augmente avec les proportions croissantes de DSPE-PEG ajoutées.

Exemple 5 : Contrôle de la taille pour des nanocapsules réalisées selon la méthode de post-insertion

Lorsque l'on souhaite obtenir des temps de circulation particulièrement longs ou que l'on désire introduire des ligands, il faut avoir recours à la méthode de post-insertion telle que décrite au niveau de l'exemple 3. Ainsi, on génère au préalable des nanocapsules exemptes de DSPE-PEG pour lesquelles il est possible d'ajuster la taille en faisant varier le ratio massique entre le total des lipides et tensioactifs constituant la surface des particules

sur la totalité de tous les lipides et tensioactifs entrant dans la composition de la préparation (surface+cœur). Les relations entre ce rapport Lipides de la surface/total des lipides et la taille des nanocapsules obtenues, se prêtant à la méthode de post-insertion, est présenté sur la figure 2.

5 Les formulations présentées au niveau de la figure 2 ont été réalisées pour une quantité d'environ 1 g de lipides. Les quantités de HSPC, Labrafac® cc et NaCl sont constantes et correspondent à celles employées au niveau de l'exemple 4. Les quantités de Solutol HS15 employées, les rapports Lipides de la surface/total des lipides (rapport S/T) correspondants
10 sont reportés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5

Solutol HS15 (mg)	Rapport S/T
400,6	48,6%
413,2	49,2%
445,9	50,9%
504,2	53,5%

15 Par la suite il est possible d'introduire le phospholipide pégylé DSPE-PEG par le procédé de post-insertion afin d'obtenir les nanocapsules furtives conformes à l'invention. Le procédé de post-insertion est réalisé selon l'exemple 3 pour une proportion totale finale de 6 mol% en DSPE-PEG 2000 ou 5000.

20 Les tailles obtenues pour les formulations mères (série SM), exemptes de DSPE-PEG, ayant respectivement 504, 446 et 401 mg de Solutol HS15 et les formulations filles conformes à l'invention ayant fait l'objet d'une incorporation de DSPE-PEG 2000 et 5000 par ledit procédé de post-insertion sont représentées au niveau de la figure 3.

25 Ainsi, l'insertion de DSPE-PEG₂₀₀₀ se traduit par une augmentation du diamètre de 7,2 nm en moyenne. L'augmentation de taille est plus marquée

pour le DSPE-PEG₅₀₀₀ qui présente une augmentation moyenne de 9,1 nm sur le diamètre des particules.

Sur la base de ces augmentations de diamètre, qui témoignent de l'insertion effective de phospholipides pégylé à la surface des nanocapsules lipidiques, et connaissant l'évolution de la taille des nanocapsules exemptes de PEG en fonction du rapport surface/lipides totaux (figure 2), il est possible d'adapter la taille des nanocapsules conformes à l'invention de manière à faciliter l'extravasation au niveau des fenestrations présentes au niveau de l'endothélium de capillaires tumoraux particuliers.

D) Résultats des études de furtivité menées *in vivo* avec les nanocapsules conformes à l'invention

Exemple 6 : cinétique de disparition du vecteur (données comparatives PEG₂₀₀₀/ PEG₅₀₀₀)

La furtivité des nanocapsules conformes à l'invention a été évaluée dans une étude comparative entre une formulation de nanocapsules à base de 3,34 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ (courbe "2k-3,34") et une formulation de nanocapsules à base de DSPE-PEG₅₀₀₀, dont la proportion molaire en DSPE-PEG₅₀₀₀ est de 1,41mol% ("5k-1,41"). Ces formulations ont été réalisées selon ledit procédé classique tel que décrit au niveau des exemples 1 et 2.

Pour ce faire, des solutions de nanocapsules conformes à l'invention ont été injectées par voie intraveineuse à des rats mâles (Sprague-Dawley, 325g) à raison de 4 rats par formulation. Les doses de lipides injectées ont été choisies pour être environ 10 fois inférieures aux doses à partir desquelles des phénomènes de « saturation du SPM » peuvent avoir lieu (ce qui se traduirait par des temps de circulation prolongés en raison du débordement des capacités d'épuration). Ainsi une solution de nanocapsules

comprenant une quantité totale de lipides de 2 mg dans un volume de 400 μ l a été injectée à chaque rat.

Les nanocapsules conformes à l'invention ont préalablement été marquées avec un traceur radioactif tritié : le [3 H]-Cholestérol Hexadécyl Ether qui est un marqueur non échangeable. La dose de marqueur radioactif représente 3 micro Curie (μ Ci) par rat. Neuf prélèvements sanguins successifs ont été effectués après l'injection des nanocapsules à 5, 15 et 30 minutes, puis à 1,2,4,8,12 et 24 heures.

Les échantillons sanguins sont mis à digérer en présence de Soluene 350 (Canberra Packard, Mississauga, Canada) pendant une heure à 50°C. Après digestion, les échantillons sanguins sont décolorés à l'aide d'eau oxygénée 30%. On ajoute alors le liquide de scintillation Hionic Fluor (Canberra) et on laisse les échantillons au repos pendant une nuit. Le dosage de la quantité de nanocapsules marquées présentes dans le sang aux différents temps est alors effectué par comptage de la radioactivité au moyen d'un compteur à scintillation. Le dosage de témoins permet de déterminer le nombre de dpm (désintégrations par minute) correspondant à 100% de la dose. Le volume de sang total chez les rats est de 75 ml/kg. Ainsi il est possible d'exprimer les résultats en pourcentage de la dose totale injectée. Les résultats de ce dosage sont récapitulés à la figure 4.

Le tableau 6 donne le nom, la taille moyenne et la proportion molaire de DSPE-PEG incorporé selon le procédé classique dans l'enveloppe externe desdites nanocapsules lipidiques.

La nomenclature employée rend compte de la masse molaire de la partie PEG (2k, 5k pour 2000 ou 5000) et du pourcentage molaire de DSPE-PEG par rapport à l'ensemble des lipides de la surface.

Tableau 6 : Descriptif des formulations employées

Nom	Taille (nm)	DSPE-PEG
2k-3,34	77 \pm 15	3,34 mol%
5k-1,41	61 \pm 15	1,41 mol%

Ces résultats montrent que la demi-vie plasmatique de nanocapsules conformes à l'invention se situe entre 2 et 3 heures chez le rat aussi bien pour les nanocapsules à base de DSPE-PEG₂₀₀₀ à 3,34 mol% que pour les nanocapsules à base de DSPE-PEG₅₀₀₀ à 1,41 mol%. Toutefois, il est important de noter l'effet furtif supérieur apporté par les chaînes de DSPE-PEG₅₀₀₀. En effet, pour un nombre de moles plus de deux fois inférieur au nombre de moles de DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des nanocapsules, les chaînes de PEG plus longues procurent un effet protecteur comparable à celui conféré par les chaînes ayant une masse de 2000 g/mol.

Exemple 7 : Etude comparative des nanocapsules de l'invention par rapport aux nanocapsules de l'art antérieur

Une étude, similaire à celle présentée dans l'exemple 6, visant à comparer les vitesses de disparition dans le sang des nanocapsules lipidiques conformes à l'invention et des nanocapsules lipidiques telles que décrites dans l'art antérieur au niveau du brevet N° WO 01/64328, a été réalisée. Les résultats obtenus pour les formulations 1 à 4 ont été obtenus sur le rat dans des conditions identiques aux résultats présentés figure 4. Les formulations représentées sont brièvement décrites ci-dessous et les données obtenues sont reportées au niveau de la figure 5. Cette figure comprend également à titre de comparaison les données obtenues par Stólnik *et al.* (disponibles pour 3 heures de cinétique sanguine seulement) ainsi que par Cahouet *et al.*

Formulation 1 : Nanocapsules conventionnelles telles que décrites dans le brevet N° WO 01/64328 : le tensioactif lipophile est le Lipoïd® S75-3, qui n'est pas une lécithine pure (70% de phosphatidylcholine) et les particules sont dépourvues de PEG ;

Formulation 2 : Nanocapsules à base de Lipoïd® S75-3 mais comportant du DSPE-PEG₂₀₀₀ (1,65 mol%) introduit selon le procédé classique ;

5 **Formulation 3 :** Nanocapsules à base de HSPC (>99% de phosphatidylcholine) et de DSPE-PEG₅₀₀₀ (1,41 mol%), nanocapsules conformes à l'invention à base de PEG₅₀₀₀ introduit selon le procédé classique ;

10 **Formulation 4 :** Nanocapsules-HSPC-PEG₂₀₀₀ (3,34 mol%), nanocapsules conformes à l'invention à base de PEG₂₀₀₀, quantité maximale incorporable selon le procédé classique pour HSPC ;

15 **FS :** Formulation Stolnik : micelles de PLA-PEG en proportion 13:5 (la partie PEG ayant une masse molaire de 2000 g/mol) dont le diamètre est de l'ordre de 75 nm. Les données de la meilleure formulation sont relevées d'après le graphique contenu dans l'article publié (Stolnik *et al.*, J. Drug Target., 9:361, 2001). Ces données ont été également obtenues suite à l'injection intraveineuse chez le rat d'une quantité non saturante pour le SPM
20 de nanoparticules ;

25 **NL A.A. :** Formulation Nanocapsules conventionnelles de l'Art Antérieur. Ces données ont été relevées à partir des travaux de Cahouet et al. (« 13^{èmes} Symposium international sur la Microencapsulation », Angers (France), Sept. 2001). Ces résultats ont également été obtenus suite à l'injection intraveineuse (dose inconnue) chez le rat de Nanocapsules lipidiques réalisées par les auteurs susnommés selon une formulation à base de Lipoïd® S75-3 décrite dans le brevet N° WO 01/64328.

30 Les formulations 1 et 2 représentent respectivement des formulations de nanocapsules conventionnelles dont la surface comprend du Lipoïd®

S 75-3 (lécithine comprenant des impuretés) et ces mêmes nanocapsules dont la surface comprend en plus 1,65 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀. Ce taux est proche de la teneur maximale incorporable pour des nanocapsules comprenant du Lipoïd® S 75-3 réalisées selon le procédé classique. La teneur en DSPE-PEG₂₀₀₀ de la formulation 4 est également à son maximum de par le procédé classique. L'absence d'impuretés et l'homogénéité de la phosphatidylcholine HSPC permettent l'incorporation de telles teneurs de DSPE-PEG dans les nanocapsules conformes à l'invention (pratiquement deux fois plus importantes qu'avec le Lipoïd® S 75-3).

Ces résultats montrent que les nanocapsules conformes à l'invention (formulations 3 et 4) présentent une clairance significativement moins élevée que les nanocapsules lipidiques de l'art antérieur (formulation 1, telle que décrites dans le brevet N° WO 01/64328) qui sont très rapidement éliminées du compartiment sanguin. Ainsi, pour la formulation 1 seulement 10% de la dose injectée se trouve encore présente dans le sang au bout d'une heure. Les nanocapsules de l'art antérieur ne présentent donc aucun caractère furtif. Par ailleurs, l'incorporation de DSPE-PEG₂₀₀₀ aux nanocapsules de l'art antérieur (formulation 2) n'améliore que très légèrement leur rémanence dans la circulation sanguine : leur temps de demi-vie est également inférieur à une heure. En effet, les augmentations respectives des ASC (Aire sous la Courbe entre 5 minutes et 24 heures) par rapport à la formulation 1 ($ASC_{Form\ x} / ASC_{Form\ 1}$) sont :

- Formulation 2 : 1,09
- Formulation 3 : 2,31
- Formulation 4 : 2,68.

Par ailleurs, tel que mentionné au niveau de la description de l'art antérieur, les nanocapsules conformes au brevet N° WO 01/64328 ont également fait l'objet d'une étude *in vivo* chez le rat par Cahouet *et al.* La cinétique d'élimination sanguine de ces nanocapsules présente un profil (formulation NL A.A. en figure 5) qui est légèrement supérieur à celui obtenu

pour la formulation 1 et peu différent de celui de la formulation 2, probablement en raison de la différence de dose injectée (NL A.A. : dose inconnue). Le temps de demi-vie des nanocapsules de Cahouet *et al.* (NL A.A.) est inférieur à une heure (45 minutes précisément). Le profil que la demanderesse a obtenu pour la formulation 1 est ainsi peu différent de celui présenté dans l'étude de l'art antérieur. Ces deux formulations témoins qui ne comprennent pas de chaîne de poly(éthylène glycol) supérieure à 1000 g/mol montrent l'inefficacité des courtes chaînes de PEG du Solutol® HS15 (660 g/mol) à conférer une protection contre l'élimination rapide de la circulation sanguine. Ainsi ces deux formulations ne présentent pas de caractère furtif ni de circulation prolongée (10% de la dose injectée à la 2^e heure) et peuvent être considérées comme références non-furtives permettant d'évaluer l'effet des modifications à la composition des vecteurs (utilisation d'une lécithine de pureté élevée en phosphatidylcholine), notamment l'ajout de longues chaînes de PEG.

La figure 5 représente également les données de l'art antérieur telles que présentées dans la publication de Stolnik *et al.* (légende FS). Leur formulation de micelles de PLA-PEG présente un caractère furtif avec un peu moins de 40% de la dose injectée encore présente dans la circulation sanguine au bout de deux heures. Toutefois, le caractère furtif de cette préparation colloïdale est inférieur à celui des nanocapsules conformes à l'invention qui présentent plus de 50% et plus de 60% de la dose injectée au bout de la 2^e heure pour les formulations 3 (DSPE-PEG₅₀₀₀) et 4 (DSPE-PEG₂₀₀₀) respectivement. Étant donné que la proportion de nanocapsules conformes à l'invention (formulations 3 et 4) présentes dans la circulation sanguine au cours des 4 premières heures suivant l'injection est nettement supérieure à celle des nanoparticules furtives de l'art antérieur (formulation FS), la quantité de vecteur susceptible d'atteindre les cellules tumorales solides et/ou circulantes se trouvera avantageusement augmentée, augmentant ainsi les chances de succès du traitement.

Exemple 8 : Potentialisation du caractère furtif apporté par le procédé de post-insertion

Une étude *in vivo* réalisée dans les mêmes conditions que les précédentes a été conduite avec 4 formulations différentes. Ainsi, afin d'évaluer l'intérêt du procédé de post-insertion, la demanderesse a comparé le caractère furtif de trois formulations réalisées selon ledit procédé de post-insertion au caractère furtif de la meilleure formulation réalisée selon le procédé classique. Les quatre formulations qui ont fait l'objet de cette étude *in vivo* sont les suivantes :

Formulation 2k-3,34 : Nanocapsules-HSPC-PEG₂₀₀₀ (3,34 mol%), nanocapsules conformes à l'invention à base de PEG₂₀₀₀, quantité maximale incorporable selon le procédé classique pour HSPC. Cette formulation correspond à la formulation 4 de l'exemple 7, injectée à un nouveau groupe de 4 rats ;

Formulation 2k-6% : Nanocapsules à base de HSPC ayant fait l'objet de l'incorporation d'une quantité de DSPE-PEG₂₀₀₀ correspondant à 6 mol% de la totalité des lipides de la surface des nanocapsules conformes à l'invention selon le procédé de post-insertion, tel que détaillé au niveau de l'exemple 3 ;

Formulation 5k-6% : Nanocapsules à base de la même formulation mère comprenant de l'HSPC, réalisée pour l'obtention des nanocapsules de la formulation 2k-6%, mais ayant fait l'objet de l'incorporation de DSPE-PEG₅₀₀₀ par le procédé de post-insertion, nanocapsules conformes à l'invention ;

Formulation 2k-10% : Nanocapsules à base de la même formulation mère comprenant de l'HSPC, réalisée pour l'obtention des nanocapsules de la formulation 2k-6%, mais ayant fait l'objet de l'incorporation de 10 mol% de

DSPE-PEG₂₀₀₀ par le procédé de post-insertion, nanocapsules conformes à l'invention.

Les résultats obtenus au niveau de l'élimination sanguine des trois formulations détaillées ci-dessus sont présentés au niveau de la figure 6.

5 Les données présentées au niveau de la figure 6 démontrent l'intérêt du procédé de post-insertion. En effet, ledit procédé de post-insertion permet d'obtenir des nanocapsules conformes à l'invention dont le caractère furtif est nettement supérieur à celui de nanocapsules conformes à l'invention mais réalisées selon le procédé classique. Par ailleurs, cette étude démontre
10 également la stabilité et la conservation du caractère furtif dans le temps des nanocapsules conformes à l'invention. La formulation 2k-3,34 a été réalisée 3 mois plus tôt et injectée de nouveau pour la présente étude. Les profils obtenus sont comparables (on retrouve une quantité légèrement supérieure à 22% de la dose injectée au bout de la 4^e heure, comme au niveau de la
15 figure 4). Les formulations présentées sur la figure 6 présentent un caractère furtif prononcé. Les formulations de nanocapsules témoins (sans DSPE-PEG) présentent toutes (formulation 1 de l'exemple précédent et celle de l'étude de l'art antérieur) moins de 10% de la dose résiduelle au bout de deux heures.

20 Le procédé de post-insertion permet d'incorporer des quantités de DSPE-PEG supérieures à celles qu'il est possible d'incorporer selon le procédé classique, comme le montrent les profils sanguins de la figure 6, ce qui permet d'améliorer la furtivité des préparations et de les adapter à des applications nécessitant des proportions supérieures de nanocapsules dans
25 le sang au cours des 12 premières heures suivant leur injection. Ainsi, les formulations réalisées selon ledit procédé de post-insertion présentent toutes environ 60% de la dose injectée au bout de la 4^e heure. A la 8^e heure la dose résiduelle de nanocapsules de la formulation 2k-6% est de plus de 18%. Une même proportion de 6 mol% de DSPE-PEG, mais présentant des chaînes de
30 PEG plus longues (DSPE-PEG₅₀₀₀) permet d'obtenir plus de 40% de la dose injectée à la 8^e heure. Lorsque l'on introduit davantage de DSPE-PEG₂₀₀₀, jusqu'à 10 mol%, il est possible d'obtenir un profil légèrement supérieur à

celui de la formulation 5k-6% avec 50% de la dose injectée à la 8^e heure. Le caractère furtif des formulations de nanocapsules conformes à l'invention réalisées selon le procédé de post-insertion est ainsi nettement supérieur à celui observé pour des nanoparticules pleines dites furtives, telles que

5 . décrites dans la littérature.

REVENDEICATIONS

1. Nanocapsules lipidiques furtives constituées d'un cœur
5 essentiellement lipidique liquide ou semi-liquide à température ambiante et
d'une enveloppe lipidique externe comprenant au moins un tensioactif
hydrophile de nature lipidique, au moins un tensioactif lipophile de nature
lipidique et au moins un dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) dont la
10 masse molaire de la partie poly(éthylène glycol) est supérieure ou égale à
1000 g/mol, de préférence supérieure ou égale à 2000 g/mol.

2. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 1,
caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile est une lécithine dont la
15 proportion en phosphatidylcholine est au moins égale à 95 %, de préférence
supérieure à 99 %.

3. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à
2, caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile a une température de
transition liquide/gel au moins égale à 25°C, de préférence supérieure à
20 37°C.

4. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à
3, caractérisées en ce que le tensioactif lipophile est un phospholipide
comprenant des chaînes acyle d'au moins 16 atomes de carbone.

5. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à
4, caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile est choisi parmi le HSPC
(Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine), le DSPC (Distéaroyl
Phosphatidylcholine), et le DPPC (Dipalmitoyl Phosphatidylcholine) ainsi que
30 leurs mélanges.

REVENDECATIONS

5 1. Nanocapsules lipidiques furtives constituées d'un cœur
essentiellement lipidique liquide ou semi-liquide à température ambiante et
d'une enveloppe lipidique externe comprenant au moins un tensioactif
hydrophile de nature lipidique, au moins un tensioactif lipophile de nature
lipidique et au moins un dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) dont la
masse molaire de la partie poly(éthylène glycol) est supérieure ou égale à
10 1000 g/mol, de préférence supérieure ou égale à 2000 g/mol.

 2. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 1,
caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile est une lécithine dont la
proportion en phosphatidylcholine est au moins égale à 95 %, de préférence
15 supérieure à 99 %.

 3. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à
2, caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile a une température de
transition gel/liquide au moins égale à 25°C, de préférence supérieure à
20 37°C.

 4. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à
3, caractérisées en ce que le tensioactif lipophile est un phospholipide
comprenant des chaînes acyle d'au moins 16 atomes de carbone.

25 5. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à
4, caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile est choisi parmi le HSPC
(Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine), le DSPC (Distéaroyl
Phosphatidylcholine), et le DPPC (Dipalmitoyl Phosphatidylcholine) ainsi que
30 leurs mélanges.

6. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile représente entre 5 et 30 mol % des molécules composant ladite enveloppe lipidique externe.

5 7. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisées en ce que ledit tensioactif hydrophile est choisi parmi les poly(éthylène glycol) alkyl esters et les poly(éthylène glycol) alkyl éthers ainsi que leurs mélanges.

10 8. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisées en ce que ledit tensioactif hydrophile est un tensioactif non ionique de type poly(éthylène glycol)-660 12-hydrostéarate comportant une chaîne de 15 unités d'éthylène glycol.

15 9. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisées en ce que ledit tensioactif hydrophile représente entre 60 et 90 mol% des molécules composant ladite enveloppe lipidique externe, de préférence 80 mol%.

20 10. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisées en ce que ledit dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) comporte une partie hydrophobe permettant son ancrage au niveau de ladite enveloppe lipidique externe et une partie hydrophile de type poly(éthylène glycol) tournée vers l'extérieur desdites nanocapsules lipidiques et qui
25 confère à leur surface des propriétés hydrophiles.

 11. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisées en ce que ledit dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) est choisi parmi les phospholipides biodégradables.

30

 12. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisées en ce que lesdits phospholipides biodégradables sont

6. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que ledit tensioactif lipophile représente entre 5 et 30 mol % des molécules composant ladite enveloppe lipidique externe.

5 7. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisées en ce que ledit tensioactif hydrophile est choisi parmi les poly(éthylène glycol) alkyl esters et les poly(éthylène glycol) alkyl éthers ainsi que leurs mélanges.

10 8. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisées en ce que ledit tensioactif hydrophile est un tensioactif non ionique de type poly(éthylène glycol)-660 12-hydrostéarate comportant une chaîne de 15 unités d'éthylène glycol.

15 9. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisées en ce que ledit tensioactif hydrophile représente entre 60 et 90 mol% des molécules composant ladite enveloppe lipidique externe, de préférence 80 mol%.

20 10. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisées en ce que ledit dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) comporte une partie hydrophobe permettant son ancrage au niveau de ladite enveloppe lipidique externe et une partie hydrophile de type poly(éthylène glycol) tournée vers l'extérieur desdites nanocapsules lipidiques et qui
25 confère à leur surface des propriétés hydrophiles.

11. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisées en ce que ledit dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) est choisi parmi les phospholipides biodégradables.

30

12. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 11, caractérisées en ce que lesdits phospholipides biodégradables sont

choisis parmi le DPPE-PEG_x (Dipalmitoyl Phosphatidyl Ethanolamine), le DSPE-PEG_x (Distéaroyl Phosphatidyl Ethanolamine), et le DOPE-PEG_x (Dioléoyl Phosphatidyl Ethanolamine) et le POPE-PEG (Palmitoyl Oléyl Phosphatidyl Ethanolamine) où x est supérieur ou égal à 1000 g/mol, ainsi que leurs mélanges.

13. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 12 caractérisées en ce que lesdits phospholipides biodégradables sont choisis parmi le DSPE-PEG₂₀₀₀, le DSPE-PEG₃₀₀₀ et le DSPE-PEG₅₀₀₀, ainsi que leurs mélanges.

14. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisées en ce que ledit dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) représente entre 0.5 et 12 mol%, de préférence entre 1 et 10 mol% des molécules composant ladite enveloppe lipidique externe.

15. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisées en ce que ledit cœur essentiellement lipidique représente entre 20 à 60 %, de préférence entre 25 et 50 % en poids par rapport au poids total desdites nanocapsules.

16. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisées en ce que ledit cœur essentiellement lipidique est composé d'esters d'acides gras et/ou de triglycérides et /ou d'huile.

17. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 16, caractérisées en ce que les triglycérides composant ledit cœur essentiellement lipidique sont choisis parmi les triglycérides à chaîne moyenne portant de 6 à 14 atomes de carbone et les triglycérides des acides capriques et capryliques, ainsi que leur mélanges.

18. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 16, caractérisées en ce que les esters d'acides gras composant ledit cœur essentiellement lipidique sont choisis parmi les acides gras à chaîne moyenne portant de 8 à 18 atomes de carbone, tels que le palmitate d'éthyle, l'oléate d'éthyle, le myristate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octyldodécyle, ainsi que leurs mélanges.

19. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisées en ce que leur diamètre est compris entre 50 et 150 nm, de préférence entre 80 et 120 nm.

20. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisées en ce que la surface externe de ladite enveloppe lipidique externe est de nature hydrophile et que le cœur essentiellement lipidique est de nature lipophile.

21. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisées en ce qu'elles portent à leur surface des ligands spécifiques leur conférant des capacités de ciblage actif de cellules ayant des récepteurs pour ces ligands, notamment les cellules tumorales.

22. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 21, caractérisées en ce que ledit ligand est de type saccharide ou oligosaccharide, vitamine ou encore de type oligopeptide, fragment d'anticorps ou anticorps monoclonal.

23. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisées en ce qu'elles ont une demi-vie d'au moins 2 heures dans le compartiment sanguin de l'hôte auquel elles sont administrées.

24. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisées en ce qu'elles peuvent libérer rapidement l'essentiel de leur contenu par biodégradation et notamment par digestion enzymatique.

5 25. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 24, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs.

10 26. Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 25, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs anticancéreux de nature majoritairement lipophile choisis parmi le paclitaxel et ses dérivés tels que le docétaxel, la camptothécine et ses dérivés tels que l'irinotécan, le topotécan ou le rubitécan, le busulfan, le chlorambucil, les phthalocyanines, les caroténoïdes, l'amphotéricine B, la dexaméthasone, et
15 la daunomycine.

 27. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 25 à 26, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs anticancéreux de nature amphiphile tels que la cytarabine, la
20 cyclophosphamide, le methotrexate, les dérivés fluorés tels que le 5-Fluorouracile ou le 5-fluorouridine, ou la doxorubicine.

 28. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisées en qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs
25 choisis parmi les anti-inflammatoires, les corticoïdes et les antibiotiques, les antalgiques et les anti-infectieux.

 29. Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 1 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de
30 préformation de nanocapsules dépourvues de dérivé amphiphile du poly(éthylèneglycol), puis une étape de post-insertion desdits dérivés amphiphiles du poly(éthylèneglycol) à la surface de ces nanocapsules.

24. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisées en ce qu'elles peuvent libérer rapidement l'essentiel de leur contenu par biodégradation et notamment par digestion enzymatique.

5 **25.** Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 1 à 24, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs.

10 **26.** Nanocapsules lipidiques furtives selon la revendication 25, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs anticancéreux de nature majoritairement lipophile choisis parmi le paclitaxel et ses dérivés tels que le docétaxel, la camptothécine et ses dérivés tels que l'irinotécan, le topotécan ou le rubitécan, le busulfan, le chlorambucil, les phthalocyanines, les caroténoïdes et la daunomycine.

15 **27.** Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 25 à 26, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs anticancéreux de nature amphiphile tels que la cytarabine, la cyclophosphamide, le methotrexate, les dérivés fluorés tels que le 5-
20 Fluorouracile ou le 5-fluorouridine, ou la doxorubicine.

28. Nanocapsules lipidiques furtives selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisées en qu'elles contiennent un ou plusieurs principes actifs choisis parmi les anti-inflammatoires, les corticoïdes tels que la
25 dexaméthasone et les antibiotiques, les antalgiques et les anti-infectieux tels que l'amphotéricine B.

29. Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 1 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de
30 préformation de nanocapsules dépourvues de dérivé amphiphile du poly(éthylèneglycol), puis une étape de post-insertion desdits dérivés amphiphiles du poly(éthylèneglycol) à la surface de ces nanocapsules.

30. Procédé de préparation des nanocapsules selon la revendication 29, caractérisé en ce que ladite étape de préformation comprend la synthèse de nanocapsules dépourvues du dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol) selon l'inversion de phase d'une émulsion huile/eau provoquée par plusieurs cycles de montée et descente en température.

31. Procédé de préparation des nanocapsules selon la revendication 29, caractérisé en ce que ladite étape de post-insertion comprend une première étape de co-incubation des nanocapsules préformées en présence du dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol), puis une seconde étape dite de trempe au cours de laquelle le mélange dérivé amphiphile du poly(éthylèneglycol)/nanocapsules préformées ainsi obtenu est brusquement refroidit pour atteindre une température comprise entre 0 et 5°C.

32. Procédé de préparation des nanocapsules selon la revendication 31, caractérisé en ce que l'étape de co-incubation du mélange dérivé amphiphile du poly(éthylène glycol)/nanocapsules préformées se fait à une température très légèrement supérieure à la température de transition de phase gel/liquide dudit tensioactif lipophile de nature lipidique mais inférieure à la température d'inversion de phase du mélange dérivé amphiphile du poly(éthylèneglycol)/nanocapsules préformées.

33. Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 29 à 32, caractérisé en ce que le diamètre des nanocapsules est ajusté par un ajustement de la proportion et de la longueur des chaînes hydrophiles du dérivé amphiphile lorsqu'il est introduit au niveau de l'étape de post-insertion.

34. Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 1 à 28, caractérisé en ce que le diamètre des nanocapsules est ajusté par un ajustement des proportions en sel, en tensioactif hydrophile

et de la pureté du tensioactif lipophile dans le mélange de départ du procédé de synthèse classique.

5 **35.** Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 29 à 34, caractérisé en ce qu'il est exempt de solvants organiques et utilise seulement des composés biodégradables et approuvés pour usage parentéral.

10 **36.** Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 29 à 35, caractérisé en ce que lesdites nanocapsules sont stérilisées par filtration stérilisante sur filtre d'un diamètre de 0,45 μm à 0,22 μm .

15 **37.** Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 29 à 36, caractérisé en ce que lesdites nanocapsules sont lyophilisées puis reconstituées extemporanément sous forme de suspension colloïdale.

20 **38.** Composition pharmaceutique comprenant les nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 23 à 28.

25 **39.** Composition pharmaceutique selon la revendication 38 caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'une suspension aqueuse colloïdale contenant lesdites nanocapsules lipidiques.

30 **40.** Utilisation des nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 23 à 28 pour la fabrication d'un médicament, destiné au traitement par voie sanguine des cancers et en particulier des tumeurs solides ou circulantes.

41. Utilisation selon la revendication 40 pour le traitement de tumeurs circulantes par ciblage actif.

et de la pureté du tensioactif lipophile dans le mélange de départ du procédé de synthèse classique.

5 **35.** Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 29 à 34, caractérisé en ce qu'il est exempt de solvants organiques et utilise seulement des composés biodégradables et approuvés pour usage parentéral.

10 **36.** Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 29 à 35, caractérisé en ce que lesdites nanocapsules sont stérilisées par filtration stérilisante sur filtre d'un diamètre de 0,45 μm à 0,22 μm .

15 **37.** Procédé de préparation des nanocapsules selon l'une des revendications 29 à 36, caractérisé en ce que lesdites nanocapsules sont lyophilisées puis reconstituées extemporanément sous forme de suspension colloïdale.

20 **38.** Composition pharmaceutique comprenant les nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 1 à 28.

25 **39.** Composition pharmaceutique selon la revendication 38 caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'une suspension aqueuse colloïdale contenant lesdites nanocapsules lipidiques.

30 **40.** Utilisation des nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 23 à 28 pour la fabrication d'un médicament, destiné au traitement par voie sanguine des cancers et en particulier des tumeurs solides ou circulantes.

5 **42.** Utilisation selon la revendication 40, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des tumeurs solides par ciblage passif suite à l'extravasation desdites nanocapsules au travers des capillaires tumoraux.

10 **43.** Utilisation des nanocapsules lipidiques selon la revendication 28 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des inflammations et/ou des infections des tissus notamment chez l'Homme.

15 **44.** Utilisation selon l'une des revendications 40 à 43, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré par voie parentérale, injecté dans la circulation de l'hôte par voie intravasculaire, en particulier par voie intraveineuse, intra-artérielle, intrapéritonéale et intramusculaire, mais également par voie sous cutanée et en particulier intra-articulaire.

20 **45.** Utilisation des nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 1 à 22, pour la capture de molécules hydrophobes présentes dans la circulation sanguine suite à une intoxication.

41. Utilisation des nanocapsules lipidiques selon la revendication 40 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de tumeurs circulantes par ciblage actif.

5 42. Utilisation selon la revendication 40, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des tumeurs solides par ciblage passif suite à l'extravasation desdites nanocapsules au travers des capillaires tumoraux.

10 43. Utilisation des nanocapsules lipidiques selon la revendication 28 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des inflammations et/ou des infections des tissus notamment chez l'Homme.

15 44. Utilisation selon l'une des revendications 40 à 43, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré par voie parentérale, injecté dans la circulation de l'hôte par voie intravasculaire, en particulier par voie intraveineuse, intra-artérielle, intrapéritonéale et intramusculaire, mais également par voie sous cutanée et en particulier intra-articulaire.

20 45. Utilisation des nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 1 à 28 pour la fabrication d'un médicament destiné à la capture de molécules hydrophobes présentes dans la circulation sanguine suite à une intoxication.

25

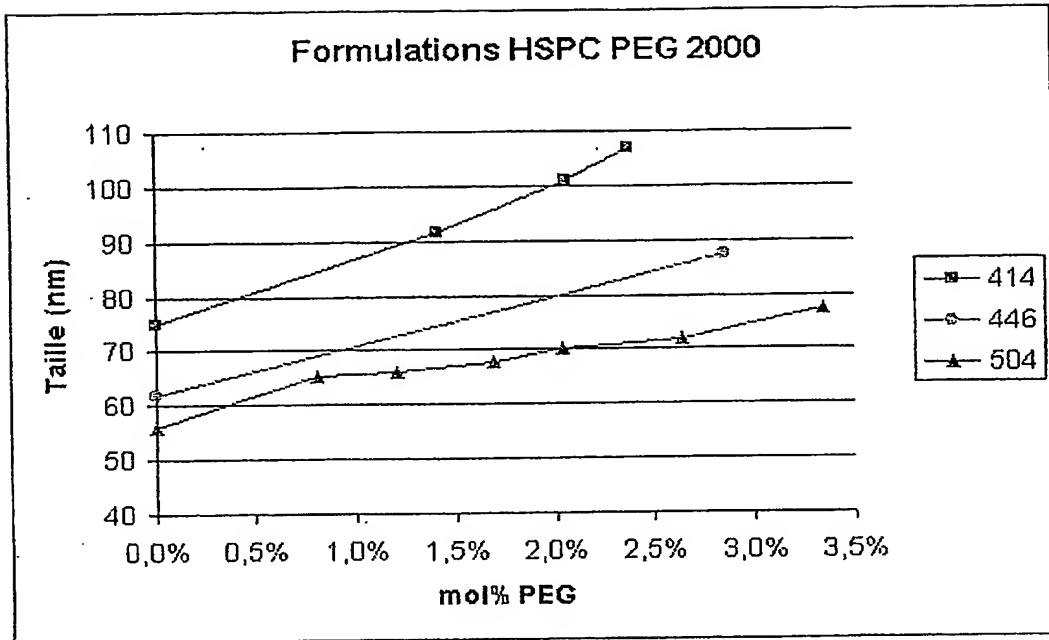


Figure 1

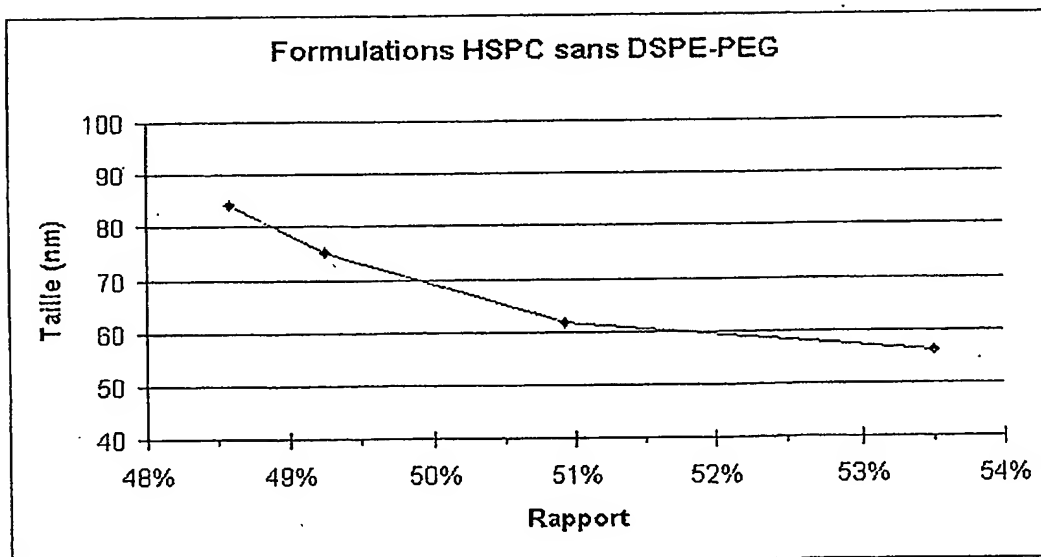


Figure 2

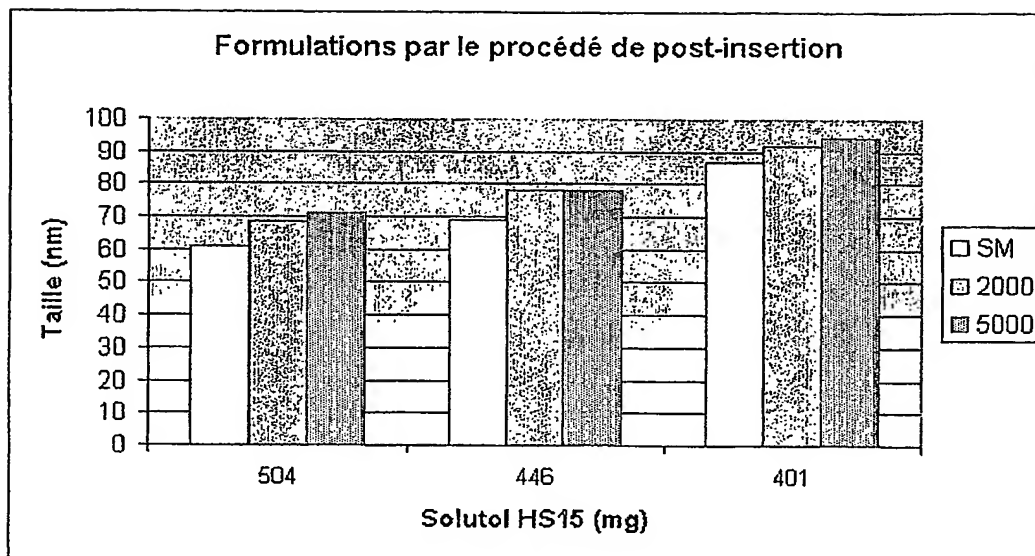


Figure 3

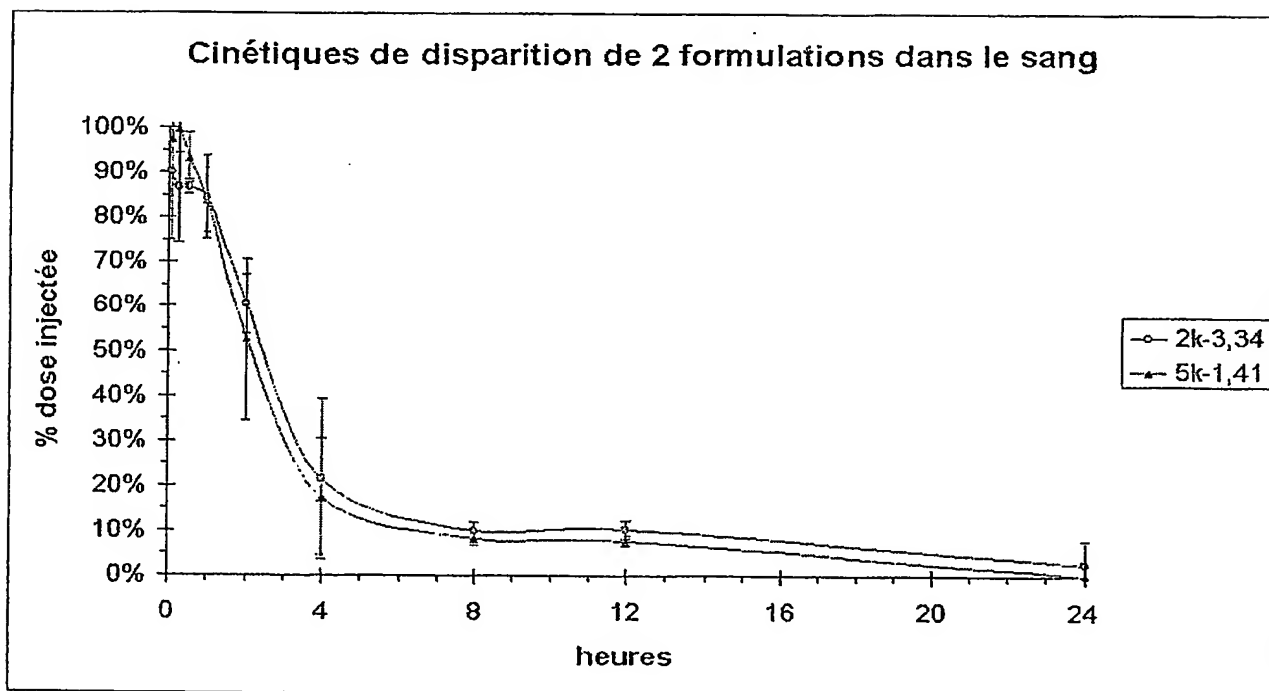


Figure 4

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 2608

Vos références pour ce dossier (facultatif)		239896 D20396 NR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0207175	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
NANOCAPSULES LIPIDIQUES FURTIVES, PROCEDE DE PREPARATION ET UTILISATION COMME VECTEUR DE PRINCIPE(S) ACTIF(S).			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
ETHYPHARM : 21 rue Saint Mathieu 78550 HOUDAN - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		HOARAU Didier	
Prénoms			
Adresse	Rue	3671, rue Drolet	
	Code postal et ville	H2X3H7 MONTREAL QUEBEC-CANADA	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DELMAS Pascal	
Prénoms			
Adresse	Rue	97, Mc Culloch	
	Code postal et ville	H2Y3L8 OUTREMONT QUEBEC-CANADA	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LEROUX Jean-Christophe	
Prénoms			
Adresse	Rue	329 Notre-Dame E, Apt 327	
	Code postal et ville	MONTREAL, QUEBEC-H2Y 3Z2 CANADA	
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
